



**Universidade
de Aveiro
2012**

Departamento de Química

**Rui Pedro
Oliveira Silva**

**Aplicação de Nanopartículas Magnéticas para
caracterização de Proteases**



**Rui Pedro
Oliveira Silva**

**Aplicação de Nanopartículas Magnéticas para
caracterização de Proteases**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, especialização em Biotecnologia Molecular, realizada sob a orientação científica do Doutor Rui Vitorino, Investigador Auxiliar do Centro de Investigação em Química Orgânica de Produtos Naturais e Agroalimentares (QOPNA) do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Ana Luísa Daniel da Silva, Investigadora Auxiliar do Centro de Investigação em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CICECO) da Universidade de Aveiro.

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho

o júri

Presidente

Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva
Investigador auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Ana Cristina de Fraga Esteves
Prof. Auxiliar Convidada do Dep. Biologia da Universidade de Aveiro

Doutor Rui Miguel Pinheiro Vitorino
Investigador Auxiliar do Centro de Investigação em Química Orgânica de Produtos Naturais e Agroalimentares (QOPNA) do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Luísa Daniel da Silva
Investigadora Auxiliar do Centro de Investigação em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CICECO) da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar aos meus orientadores por todo o conhecimento partilhado e pela ajuda, que sem a qual, a realização deste trabalho não teria sido possível. Agradeço também a todos os professores que fizeram parte do meu percurso académico e que ajudaram a fazer de mim a pessoa que sou hoje. Agradeço a minha família por me ter apoiado desde o primeiro momento nesta jornada. E por fim agradeço a todos os meus amigos por todos os momentos passados nestes últimos anos, os quais recordarei para sempre.

À Doutora Ana Violeta Girão pelas imagens de microscopia eletrónica e por toda a ajuda e ensinamentos que me transmitiu sobre esta técnica.

À Mestre Celeste Azevedo pelo apoio na técnica espectroscópica FTIR.

Ao investigador Nuno Silva pelas medidas magnéticas efetuadas.

À Doutora Maria João pelas medidas de BET.

Agradeço à FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia (Pest-C/CTM/LA0011; PTDC/CTM-NAN/120668/2010); FSE e POPH pelo financiamento e à Rede Nacional de Microscopia Eletrónica (RMNE) pelas imagens TEM.

.

palavras-chave

Nanopartículas magnéticas, funcionalização, proteases, inibidores, biofluidos, caracterização, enriquecimento.

Resumo

Durante vários anos, as proteases foram vistas como enzimas cuja função era, fundamentalmente, a degradação de proteínas em processos como a digestão, coagulação sanguínea entre outros. Contudo, com o aumento do conhecimento científico da estrutura e função destas enzimas, esta visão foi sendo progressivamente alterada e atualmente as proteases são reconhecidas pela sua importância na sinalização celular em diversos processos biológicos. A caracterização do modo de atuação destas enzimas é importante. Para tal, o desenvolvimento de abordagens experimentais que permitam o enriquecimento e caracterização de proteases será crucial.

No presente trabalho, foram sintetizadas e caracterizadas nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, acopladas com inibidores específicos para proteases existentes em diversos biofluidos. Estudou-se o efeito da funcionalização química da superfície das nanopartículas magnéticas na estrutura e morfologia das nanopartículas. Após o acoplamento com os inibidores, foi testada a capacidade de interação destas nanopartículas com as proteases presentes nos biofluidos.

Os resultados evidenciaram que após a funcionalização e acoplamento com os inibidores em estudo, não ocorreu alteração da estrutura cristalina e da morfologia das nanopartículas, não se tendo ainda verificado fenómenos de aglomeração. Os resultados obtidos por SDS-PAGE permitiram constatar que as nanopartículas com grupos carboxilo com ação quelante à superfície (NPs@EDTA) apresentaram capacidade para enriquecer especificamente metaloproteases, uma família de proteases cujo centro catalítico possui cátions metálicos (Zn^{2+}). Estes resultados foram ainda validados por zimografia tendo-se a ocorrência de ligações específicas entre as metaloproteases e os inibidores ligados às nanopartículas magnéticas. No caso dos resultados do SDS-PAGE das NPs@aprotinina foi possível observar especificidade das interações entre as NPs e proteínas-alvo da saliva, não se tendo observado a ligação de proteínas abundantes na saliva, como a amilase, às NPs.

Em suma, no presente trabalho desenvolveu-se um sistema de enriquecimento de proteases de sistemas biológicos envolvendo nanopartículas magnéticas que se revelou eficaz.

keywords

Magnetic nanoparticles, functionalization, proteases, inhibitors, biofluids, characterization, enrichment.

Abstract

Proteases have been seen as enzymes involved in protein degradation, in processes like digestion or blood coagulation. However, with the increase of the scientific knowledge and comprehension about their structures and functionality, this notion has evolved and now proteases are known to participate in a wide range of biological processes. Although, the importance of proteases on those processes is recognized, studies focused on their mechanism of action are very important. In this sense, strategies that allow proteases enrichment from biological samples followed by its characterization will be crucial.

In the present work, iron oxide magnetic nanoparticles were synthesized and then coupled with specific inhibitors to proteases present in human biofluids. These nanoparticles were analyzed based on its morphology, stability in solution and other properties to evaluate the effects of the functionalization strategy. The ability of these magnetic nanoparticles coupled with inhibitors to interact with specific proteases from human biofluids was also evaluated.

The results showed that after functionalization and coupling with inhibitors, the magnetic nanoparticles maintained their morphology, dispersibility in solution and the crystalline structure. SDS-PAGE data evidenced that nanoparticles surface functionalized with chelating carboxyl groups (NPs@EDTA) allows the specific enrichment of metalloproteases, a family of proteases whose active-site has metallic ions. These results were further validated by zymography in which a substrate for metalloproteases (gelatin) was incorporated. In the zymography gel, the presence of metalloproteases was confirmed, which corroborates the specificity of the interaction between metalloproteases from biological samples and the nanoparticles coupled with inhibitors. Regarding SDS-PAGE data of NPs@aprotinine it was observed the existence of specific interactions between NPs and salivary target proteins, not being observed the binding of abundant salivary proteins, such as amylase, to the NPs.

In conclusion, functionalized magnetic nanoparticles coupled with proteases inhibitors showed high potential to be applied as specific capture systems for the characterization of proteases from biological samples.

1. Introdução

No que diz respeito à área da nanotecnologia, o que se verifica atualmente, é que o desenvolvimento de nanomateriais tem vindo a sofrer uma evolução e o seu interesse científico tem cada vez maior impacto e importância comparativamente à descoberta de novos materiais. Os estudos mais recentes têm-se voltado para a investigação de materiais mais complexos e sistemas de compósitos, nos quais é promovida a recombinação de materiais conhecidos no sentido de originar estruturas altamente complexas e que abram portas a novas possibilidades funcionais [1-3]. Enquanto a comunidade científica tem avançado na procura da criação de novos compósitos e materiais híbridos, a indústria começa, neste momento, a desenvolver e a comercializar as primeiras descobertas no ramo dos nanomateriais, de forma a colmatar as necessidades do mercado [4]. Para além de outras aplicações, a aplicação de nanopartículas magnéticas (NPs) tem sido intensivamente investigada em diversas áreas, desde a catálise (matriz imobilizadora) até à sua utilização como agente de contraste em ressonância magnética (do inglês *Magnetic resonance Imaging*) [5-9]. No entanto, tem-se mostrado bastante promissora na interface entre a nanotecnologia, a biotecnologia e a medicina, sendo referenciada como a “nanobiotecnologia”. Nesta área tem-se mostrado muito promitente, em particular quando o assunto se refere a cuidados de saúde no futuro, podendo ter um papel de destaque nas áreas de administração localizada de medicamentos, no diagnóstico de doenças, entre outras [10, 11].

1.1. Nanopartículas

Em nanotecnologia, uma partícula é definida como uma entidade de pequenas dimensões que se comporta como uma única unidade em termos de transporte e propriedades apresentando dimensões entre 1 e 100 nanómetros. As nanopartículas podem ou não expressar propriedades dependentes do seu tamanho, que sejam notoriamente distintas às apresentadas na forma macroscópica [12]. Existe um crescente interesse em estudos científicos envolvendo nanopartículas, pois muitas vezes estas afiguram-se como um ponto intermédio entre o composto na sua forma macroscópica e na sua estrutura atómica ou molecular. Geralmente partículas macroscópicas exibem propriedades físicas constantes, porém no caso das nanopartículas verifica-se com frequência que o tamanho influencia as características apresentadas. Devido às suas reduzidas dimensões algumas propriedades dos materiais encontram-se alteradas. Tal facto deve-se a fenómenos como o

confinamento quântico apresentado por partículas semicondutoras, o efeito de ressonância de plasmão de superfície, que ocorre em algumas partículas metálicas e o superparamagnetismo apresentado por partículas magnéticas [13-15].

1.2.Nanopartículas magnéticas – Características e aplicações

As nanopartículas de óxido de ferro, como por exemplo a magnetite (Fe_3O_4), são as mais estudadas dentro da família das NPs magnéticas. Para a maioria das aplicações biológicas das NPs magnéticas é fundamental a obtenção de núcleos de pequenas dimensões (1 a 100 nm), pois nestas condições estas NPs apresentam domínio magnético único e, como já foi citado, comportamento superparamagnético [16]. O superparamagnetismo ou comportamento superparamagnético consiste no facto de ocorrer desmagnetização total da amostra na ausência do campo magnético. O fenómeno de superparamagnetismo não se verifica na escala macroscópica, em que um material ferromagnético (ou ferrimagnético como no caso da magnetite) é constituído por vários domínios magnéticos e apresenta magnetização mesmo na ausência de campo magnético (Figura 1). O comportamento superparamagnético das partículas é importante, na medida em que contribui para uma menor tendência na ocorrência de fenómenos de aglomeração das partículas, [17] sendo este fator essencial em aplicações biológicas [18]. Além do enunciado, as partículas devem apresentar um tamanho reduzido e uniforme de forma a permitir que todo o sistema ostente características físicas e químicas idênticas [19].

A aplicação das nanopartículas magnéticas inclui: o enriquecimento de proteínas [20], transporte de fármacos [21], engenharia de tecidos [22], tratamento de águas [23], engenharia genética [24] e deve-se em grande parte ao facto de apresentarem um baixo custo de produção e aos tamanhos reduzidos e uniformes. Outra característica vantajosa apresentada pelas nanopartículas magnéticas é a possibilidade de serem revestidas com “capas” não nocivas para o organismo contribuindo para o incremento da sua estabilidade e biodispersibilidade em solução permitindo, consequentemente, várias aplicações *in vivo*. Um exemplo deste revestimento é o processo de silanização, no qual a partícula é revestida por sílica [25, 26]. Estas potencialidades têm vindo a ser aplicadas a biossensores [27], ressonância magnética [28], bem como no transporte de medicação anticancerígena [29]. Devido à sua elevada área de superfície e fácil separação do meio reativo, utilizando um

magneto, a aplicação das NPs em sistemas de catálise enzimática representa outra potencialidade, tendo vindo a ser cada vez mais explorada [30, 31]

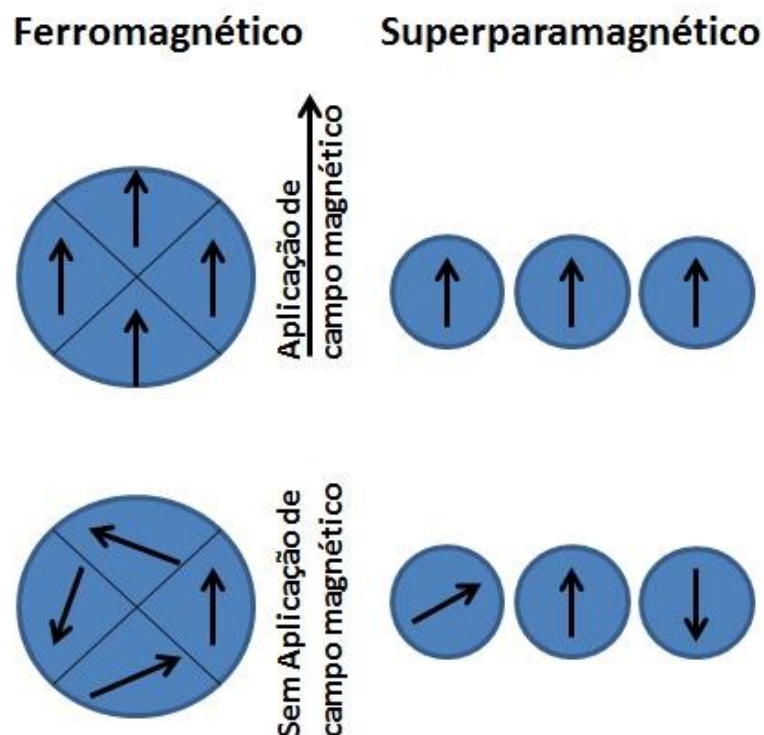


Figura 1 – Ilustração adaptada do comportamento dos momentos magnéticos, de uma partícula ferromagnética e uma partícula superparamagnética quando expostas a um campo magnético. Após remoção do campo magnético, verifica-se que as partículas ferromagnéticas ainda apresentam alguma magnetização, adaptado de [19].

Na utilização de NPs como matriz imobilizadora a funcionalização da sua superfície é fundamental uma vez que, uma modificação apropriada da superfície das NPs irá permitir a manipulação de interações com a espécie biológica de interesse, além de oferecer uma melhor dispersão e biocompatibilidade em meio aquoso [32]. Geralmente a superfície das NPs é funcionalizada utilizando organossilanos como agentes acoplantes visto que o grupo funcional à superfície destes agentes acoplantes é bastante versátil permitindo a modificação de superfícies oxigenadas [33]. Os processos pós-funcionalização de silanos funcionais têm sido utilizados para vários tipos de bioconjugação, de forma a permitir a imobilização de diferentes tipos de biomoléculas, incluindo enzimas [6], anticorpos [34], oligonucleótidos [35], entre outros.

1.3.Nanopartículas magnéticas na Proteômica

O proteoma é o conjunto de todas as proteínas existentes numa amostra biológica, sendo o objeto de estudo da proteômica. As proteínas são a base vital dos organismos vivos desempenhando várias funções fundamentais como: a sinalização celular, adesão celular, catálise, entre outras [36].

Com o aparecimento e desenvolvimento das nanopartículas magnéticas têm sido testadas várias aplicações para estes sistemas, no sentido de contribuir para uma melhor caracterização das proteínas. Devido às características do núcleo destas partículas, tais como a facilidade de separação e a funcionalização simples da superfície, estas têm vindo a ser utilizadas como matriz imobilizadora de diversos compostos, como é o caso de enzimas [37], com o intuito de desenvolver biossensores [38], sistemas de tratamento de águas [39], entre outras aplicações. Tendo em consideração a complexidade das amostras biológicas, têm-se desenvolvido estratégias de separação rápidas e eficazes que permitam com maior rapidez e confiança alcançar a identificação das proteínas. De salientar que algumas proteínas encontram-se presentes nas amostras biológicas em baixas concentrações, sendo necessário a preparação de um procedimento de pré-concentração/enriquecimento, antes da análise do proteoma por espectrometria de massa. Assim, o objetivo principal de um processo de enriquecimento consiste no isolamento das moléculas de interesse a partir de uma amostra complexa (por exemplo a saliva), reduzindo a complexidade da amostra e facilitando os passos analíticos subsequentes [40]. A implementação de nanopartículas contribuiu para fomentar o processo de desenvolvimento destes sistemas de enriquecimento estando a ser desenvolvidos, atualmente, processos de enriquecimento de proteínas/péptidos com modificações pós-traducionais, tais como a fosforilação [41] e a glicosilação [42]. Pela captura dos fosfopéptidos de uma solução de uma amostra complexa [43, 44] por complexação com o óxido metálico (TiO_2). Quando combinado com o núcleo magnético (Fe_3O_4), o processo de separação pode ser acelerado e o revestimento de TiO_2 atua como uma sonda de afinidade que interage com os fosfopéptidos, permitindo a sua separação a partir de uma amostra complexa. Quando se aplicam NPs magnéticas para a purificação de glicoproteínas, pode-se recorrer à funcionalização das NPs magnéticas com ácido aminofenilborónico, que irão interagir com glicopéptidos e glicoproteínas permitindo o enriquecimento da amostra [45]. À semelhança da funcionalização com ácido aminofenilborónico, a imobilização de lectinas (p.e.

concavalina A) à superfície de NPs permite também o enriquecimento em glicoproteínas [46]. Este sistema demonstrou bastante afinidade e especificidade às glicoproteínas, mostrando-se bastante promissor em sistemas de caracterização de glicoproteínas. Contudo, ainda se verifica a inexistência de um sistema de enriquecimento de proteases com base na utilização de nanopartículas magnéticas.

1.4. Fluidos biológicos e a sua importância no diagnóstico

Um dos objetivos iniciais da proteômica era a catalogação de todas as proteínas dos sistemas biológicos (tecidos e fluídos) de forma a poder detetar alterações que possam conduzir a um melhor diagnóstico. No entanto, com o desenvolvimento das suas técnicas/ferramentas e com o constante aumento do conhecimento acerca de alguns proteomas (p.e. saliva), este conceito tem vindo a evoluir. Atualmente, a proteômica é vista como um conjunto de metodologias que permitem uma melhor compreensão das interações proteína-proteína, a função das alterações estruturais das proteínas e como ocorrem estas alterações e por fim procurar como se refletem em organismos saudáveis ou doentes [47]. A capacidade de analisar qualitativamente e quantitativamente o proteoma dos biofluidos torna-se importante, pois acredita-se que biofluidos como: plasma, soro, saliva, entre outros são o reflexo do conjunto de órgãos presentes num organismo. Por esta razão, a utilização de biofluidos no diagnóstico ou prognóstico de doenças mostra-se promissora [48, 49].

A utilização da saliva como fluido de diagnóstico tem despertado o interesse no seio da comunidade científica, tendo sido já desenvolvidas ferramentas de diagnóstico que permitem a análise da saliva de forma a monitorizar diversas situações patofisiológicas como: doenças hereditárias [50, 51], doenças auto-imunes [52, 53], periodontite [54, 55], entre outras. A saliva é um biofluido constituído por secreções de três pares de glândulas salivares maiores, a parótida, as glândulas submandibulares e sublinguais e também, por inúmeras pequenas glândulas salivares dispersas pela cavidade oral [56, 57]. Quando comparado com o soro, a urina, o sangue e o plasma, a utilização da saliva no diagnóstico de doenças apresenta diversas vantagens: i) a sua recolha é não invasiva, é indolor e a sua coleta apresenta baixos custos associados; ii) pode ser utilizada no estudo de populações especiais em que a recolha de sangue é problemática (p.e. crianças); iii) apresenta baixa

concentração de sais quando comparada com a urina; iv) menor contribuição por parte das proteínas mais abundantes (p.e. amilase, anidrase carbónica, mucinas e outras) para a concentração total de proteína, quando comparado com o sangue e fluidos derivados [58, 59]. Uma classe de enzimas existente no proteoma salivar são as proteases. Estas enzimas são responsáveis pela catálise da degradação proteica, estando envolvidas em diversos processos fisiológicos. Recentemente, estudos demonstraram que 40-50% do material proteico existente na saliva são péptidos, sendo maioritariamente resultantes da atividade proteolítica realçando a importância da atividade proteolítica na estabilidade e manutenção das características deste biofluido [60]. Para além das proteases, a saliva caracteriza-se como um fluido corporal complexo que apresenta funções como auxiliar de digestão, ação antiviral e antibacteriana, entre outras. A saliva apresenta diversos componentes na sua composição, como o muco, responsável pela lubrificação da cavidade oral, a amilase responsável pelo início da digestão do amido, a lipase que é responsável pelo início da digestão dos lípidos, soluções de eletrólitos (Na^+ , K^+ , HCO_3^- , Cl^-). Contém ainda proteínas e enzimas, como estaterinas, que inibem a precipitação de sais fosfato de cálcio [61], proteínas ricas em prolina (PRPs) responsáveis pelo revestimento de tecido e mineralização [62], cistatinas que apresentam função antiviral e antibacteriana [63], entre outros constituintes.

1.5.Enzimas – Proteases

As enzimas são compostos proteicos bioativos muito importantes para os organismos vivos uma vez que estas catalisam reações químicas, que na sua ausência seriam muito demoradas ou praticamente impossíveis, assumindo, desta forma, um papel relevante na manutenção da homeostasia dos organismos [64]. Devido à sua estereoespecificidade [65] e regio-especificidade [66], as enzimas têm ganho relevância nos mais diversos setores industriais sendo, também, um alvo intensivo de estudos científicos. Cerca de 4000 reações bioquímicas conhecidas podem ser catalisadas por enzimas [67] e, contrariamente a outros catalisadores, estas apresentam elevada especificidade para os seus substratos. Existem diversos tipos de enzimas que variam entre si de acordo com o tipo de reação que catalisam, como por exemplo, oxidorreduções (reações de oxidação-redução, EC 1), transferases (transferem grupos químicos entre moléculas, EC 2), hidrolases (catalisam a hidrólise de várias ligações, EC 3), liases (clivam ou formam ligações por

meios que não hidrólise ou oxidação EC 4), isomerases (catalisam a transformação da molécula num isómero, EC 5) e ligases (formam ligações químicas por reações de condensação, consumindo energia, EC 6). Uma importante classe específica de enzimas e com diversas aplicações são as proteases (EC 3.4), um tipo específico de enzima que se encaixa na classe das hidrolases. Estas enzimas catalisam seletivamente, a hidrólise de ligações peptídicas, sendo essenciais à vida uma vez que estão envolvidas em inúmeros processos fisiológicos, tais como a digestão, a coagulação sanguínea, a fertilização, a diferenciação e o crescimento celular, a sinalização celular, a resposta imunitária e a apoptose [68-70]. O descontrolo ou desregulação da proteólise pode conduzir ao aparecimento ou desenvolvimento de tumores, processos inflamatórios, entre outros [71-73].

1.5.1. Classes de Proteases

Tradicionalmente, as proteases têm sido divididas em quatro grupos principais com base na sua natureza química e na natureza do centro catalítico [74]: proteases serínicas, proteases aspárticas, metaloproteases e proteases cisteínicas [75, 76]. Recentemente foram descobertas duas novas classes de proteases: as proteases de treonina e as proteases de ácido glutâmico [77], sendo os mecanismos de atuação das proteases treonínicas semelhante ao das proteases cisteínicas e serínicas e o mecanismo de atuação das proteases de ácido glutâmico semelhante ao das metaloproteases e proteases aspárticas. No caso das proteases serínicas, cisteínicas e treonínicas a clivagem da ligação peptídica realiza-se através da formação de um resíduo aminoácido [78], enquanto no caso das metaloproteases, proteases de ácido aspártico ou proteases de ácido glutâmico a clivagem da ligação peptídica ocorre através da formação de uma molécula de água nucleófila com capacidade para atacar o grupo carbonilo da ligação peptídica [79].

De todas as classes existentes, as proteases serínicas são o grupo mais estudado em enzimologia; o mecanismo de reação destas enzimas ocorre através da formação de um intermediário tetraédrico seguindo-se a perda de parte do substrato, originando um complexo acil-enzima intermediário. A quebra deste intermediário ocorre após ataque à água catalisado pela enzima levando à formação de um produto ácido. Uma característica importante desta reação (Figura 2 A) é a formação de um éster entre o oxigénio da serina e a parte acil do substrato, o que conduz à libertação da cadeia amina do substrato como primeiro produto [80]. A formação do grupo éster é comum aos vários substratos variando

apenas a constituição do grupo amina libertado. No entanto, para que ocorra a reação é necessária a presença de dois grupos -NH^+ que são essenciais para a formação de pontes de hidrogénio com o oxigénio aniónico do grupo carbonil do péptido a ser atacado [81]. Similarmente ao que acontece com as proteases serínicas, as proteases cisteínicas também atuam através da formação de um intermediário covalente [82], sendo que neste caso o átomo de enxofre da cadeia lateral da cisteína é o responsável pelo ataque nucleófilo. Em ambos os casos a histidina presente na cadeia lateral (Figura 2 A/B) está envolvida na aceitação do átomo de hidrogénio[83].

O mecanismo de atuação das proteases aspárticas decorre pela catalise da quebra de ligações peptídicas sem recorrer a um ataque nucleofílico por parte do grupo funcional da enzima [84], esta reação decorre sem que exista necessidade da formação de um intermediário no qual a enzima está covalentemente ligada ao substrato (Figura 2 C). O centro catalítico destas enzimas apresenta dois ácidos aspárticos na cadeia lateral (resíduos 35 e 215 – numeração da pepsina), razão pela qual estas enzimas apresentam (geralmente) maior atividade a valores de pH baixos sugerindo a importância dos grupos carboxilo no centro catalítico da enzima [85]. A quebra do intermediário tetraédrico origina um produto complexo com ambas as metades do substrato sendo que a sua dissociação pode resultar num grupo carboxilo ou amina (Figura 2 C) [79].

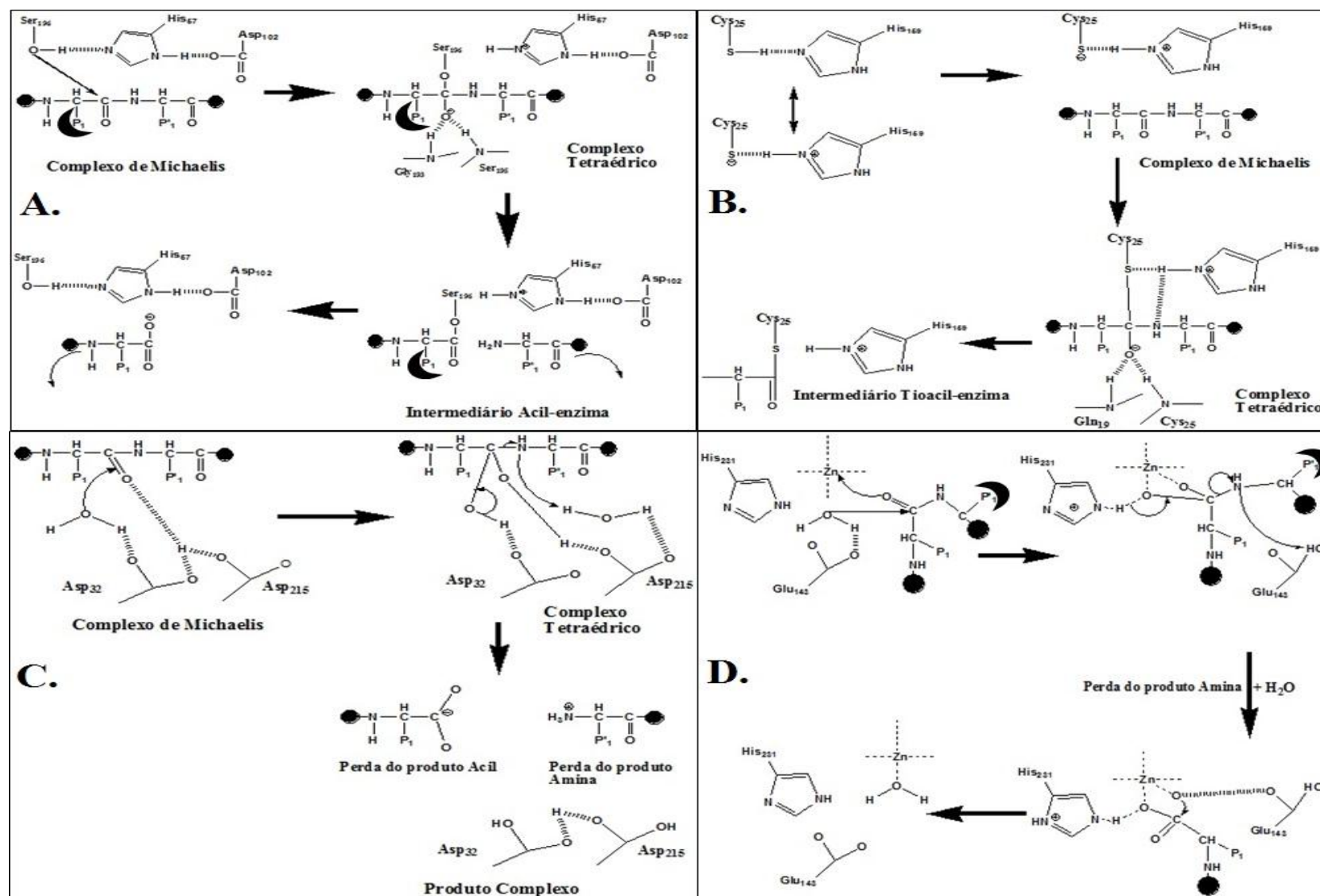


Figura 2- Representação esquemática dos passos envolvidos na catálise enzimática por proteases serínicas (A), cisteínicas (B), aspárticas (C) e metaloproteases (D) [79].

À semelhança das proteases aspárticas, as metaloproteases não formam ligações covalentes com o substrato para formar um intermediário. Estas enzimas utilizam um ião metálico que na maioria das situações é o zinco (Zn^{2+}) [76] que coordena com o substrato dando origem ao complexo intermediário. No entanto noutros casos este metal pode ser substituído por cobre ou ferro. O ião metálico tem a função de fornecer uma “força” electrofílica que permite à molécula de água atacar a ligação (Figura 2 D), esta molécula de água deve estar orientada e coordenada entre o grupo carbonilo do substrato e o ião metálico nunca deixando o centro ativo da enzima, sugerindo então que a coordenação no estado de transição com o ião metálico se mantém [86].

1.5.2. Caracterização de Proteases

Com o avançar dos anos e com a descoberta da influência das proteases na homeostasia dos organismos [87] foi emergindo o interesse no estudo destas enzimas e das suas características. A caracterização de proteases e a monitorização da sua atividade têm como objetivos estudar a natureza das enzimas, reconhecer as suas principais características, e conhecer o seu modo de atuação e a atividade enzimática. Várias técnicas têm sido criadas e adaptadas de forma a permitir a caracterização enzimática. Algumas das técnicas mais utilizadas na caracterização de proteases são a *ELISA* [88] o western blot e a zimografia. A *ELISA* consiste num ensaio imunoenzimático em que são utilizados anticorpos específicos para a proteína em estudo. Esta técnica apresenta uma elevada sensibilidade e permite a análise de vários ensaios em simultâneo. No caso do western blot [89] as proteínas são transferidas para uma membrana na qual está incorporada uma sonda (geralmente, anticorpo) específica à proteína de interesse, esta técnica permite semi-quantificar a amostra e é altamente específica, no caso das proteases uma derivação do western blot, o far-western blot é utilizada mais frequentemente. Uma vez que, o far-western blot é uma derivação do western blot em que a sonda utilizada é uma proteína que interage com a proteína-alvo, permitindo o estudo das interações proteína-proteína [90]. A zimografia [91], é uma técnica que permite a avaliação da atividade enzimática (com a impregnação de um substrato específico para uma enzima ou classe de proteases em estudo no gel de poliacrilamida) após a sua separação por SDS-PAGE em condições não desnaturantes. Outras técnicas de caracterização de enzimas recorrem à fluorescência [92], e permitem através da utilização de fluoróforos, avaliar a atividade enzimática com base na fluorescência emitida pela amostra. Por fim existem também os métodos colorimétricos

[93], onde a avaliação e quantificação enzimática é feita pela medição da absorvância de uma solução. Apesar do seu desenvolvimento, estas técnicas apresentam limitações quando aplicadas a sistemas de caracterização de proteases uma vez que estas enzimas apresentam características como por exemplo, o mecanismo de atuação em cascata destas enzimas (coagulação sanguínea) o que torna o produto final complexo e de difícil interpretação. A baixa concentração destas enzimas nas amostras biológicas é outro fator limitante no seu estudo sendo necessário um pré-tratamento da amostra de forma a obter uma fração enriquecida em proteases. Por esta razão surgiu a necessidade do desenvolvimento de novos sistemas com vista ao enriquecimento de proteases tendo por base a utilização dos respetivos inibidores na sua captura. De salientar que, contrariamente ao que ocorre noutras espécies proteicas, por vezes, as proteases estão sujeitas ao processo de autólise o que implica o seu estudo tendo em consideração os seguintes pontos: i) a pré-preparação da amostra de forma a evitar que com a degradação da amostra ocorram fenómenos de proteólise e/ou inibição que dificultem a sua interação com a matriz e consequentemente, o seu enriquecimento, ii) o procedimento a adotar de forma a conseguir enriquecer a amostra com a protease de interesse, e iii) a otimização do processo e a avaliação da homogeneidade final [94]. Verifica-se que alguns protocolos apresentados para caracterização de proteases ainda apresentam deficiências e necessitam de ser otimizados [95]. Dependendo de fatores como a amostra em estudo e o objetivo do trabalho, já existe comercialmente uma série de sistemas de enriquecimento de proteases. Apesar destes protocolos apresentarem um objetivo comum, a obtenção de uma amostra enriquecida de proteases, a sua abordagem e a forma como a enzima irá ser enriquecida varia entre eles. Alguns utilizam substratos naturais [96], enquanto outros utilizam substratos sintéticos [97], existem protocolos de purificação em fase sólida (recorrem à eletroforese p. ex.) [98], e existem também sistemas que apresentam elevada especificidade para as proteases de interesse com base na afinidade inibidor-protease [99]. A especificidade da ligação do inibidor com a protease será o fator determinante da especificidade do sistema de purificação, tornando-se então necessário o conhecimento sobre a cinética de inibição de forma a decidir sobre qual o melhor inibidor a utilizar no sistema. Assim, quando se recorre à purificação de proteases, utilizando por base a sua afinidade a um determinado inibidor é necessário ter em consideração as suas propriedades tais como: o mecanismo de

inibição, especificidade do inibidor, concentração necessária de inibidor, tempo necessário à purificação, entre outros.

Tabela 1 - Exemplos de procedimentos de enriquecimento de proteases

Enzima a enriquecer	Tipo de Amostra	Organismo	Técnicas base	Observações	Referência
Calicreína [EC 3.4.4.21]	Saliva	<i>Homo sapiens</i>	Cromatografia de troca aniônica; Cromatografia de exclusão molecular;	Várias etapas experimentais no pré-tratamento da amostra.	[100]
Carboxipeptidase B	Pâncreas	<i>Bos taurus</i>	Cromatografia em coluna de afinidade; Cromatografia em coluna	Necessária a separação da tripsina e quimiotripsina. Procedimento demorado.	[101]
Catepsina D	Útero	<i>Sus domesticus</i>	Cromatografia de afinidade	Amostra final heterogênea.	[102]
Caspase-14	Epiderme	<i>Homo sapiens</i>	Centrifugação; Ultrafiltração; Cromatografia de troca iônica; Western blotting; Cromatografia de exclusão molecular;	Vários tampões necessitam ser preparados para realização do procedimento	[103]
MPC (Proteassoma)	Hipófise	<i>Bos taurus</i>	Cromatografia de troca iônica; Ultracentrifugação; Cromatografia de exclusão molecular.	Várias centrifugações na pré-preparação da amostra.	[104]

Verifica-se que alguns dos métodos mais utilizados nos processos de enriquecimento de proteases têm por base a cromatografia (Tabela 1), no entanto denota-se a inexistência de um “protocolo base” rápido, simples e específico, que possibilite a interação das proteases com a matriz e permita em poucos passos o enriquecimento das proteases em estudo na amostra. Uma limitação comum a vários dos protocolos descritos é o recurso a técnicas relativamente morosas que requerem a utilização de vários tampões. Estes fatores são limitantes pois, como já referido, as proteases são enzimas sujeitas a processos de autólise o que poderá influenciar negativamente os resultados obtidos [105]. De forma a colmatar as limitações, a aplicação de nanopartículas magnéticas em sistemas

de enriquecimento em proteases mostra-se promissora, uma vez que as NPs magnéticas apresentam uma elevada área superficial, grande capacidade de adsorção, boa dispersibilidade em água e interagem rapidamente e eficientemente com as proteínas-alvo.

1.5.3. Proteases na saliva

Como foi já referido, a saliva é um biofluido complexo, que se encontra envolvido em diversos processos do organismo. Devido à sua potencialidade para diagnóstico, tem havido um crescente interesse no estudo do seu proteoma. Vários trabalhos têm sido realizados de forma a determinar o proteoma salivar [106, 107], e tentar perceber quais os mecanismos associados à manutenção da homeostasia deste biofluido. Com base nos resultados obtidos por espectrometria de massa, nos trabalhos de Denny P et al., e Xie, H., et al [106, 107], foram identificadas as seguintes proteases e respetivos inibidores na saliva (Tabela 2).

Tabela 2 - Proteases existentes na saliva (identificação por espectrometria de massa)

Nome	Classe	Localização Celular	Inibidores /reversibilidade	Inibidores presentes na saliva	Referências
<i>Airwaytrypsin-likeprotease</i>	Proteases serínicas	Secretada/ extracelular	Aprotinina /rev leupeptina/rev		[108-110]
Azurocidina	Proteases serínicas	Citoplasma	BPTI (inibidor de tripsina)/ver		[106, 111]
Calicreína 1	Proteases serínicas	Secretada/ extracelular	AcetilLeupeptina/rev Antitrombina/rev	Serpina C1 <i>Plasma protease C1 inhibitor</i>	[107, 112, 113]
Calicreína 10	Proteases serínicas	Secretada/ extracelular	AcetilLeupeptina/rev Antitrombina/rev	Serpina C1 <i>Plasma protease C1 inhibitor</i>	[107, 112, 113]
Calicreína 11	Proteases serínicas	Secretada/ extracelular	AcetilLeupeptina/rev Antitrombina/rev	SerpinaC1 <i>Plasma protease C1 inhibitor</i>	[107, 112, 113]
Calicreína 12	Proteases serínicas	Secretada/ extracelular	AcetilLeupeptina/rev Antitrombina/rev	Serpina C1 <i>Plasma protease C1 inhibitor</i>	[106, 112, 113]
Calicreína 13	Proteases serínicas	Secretada/ extracelular	AcetilLeupeptina/rev Antitrombina/rev	Serpina C1 <i>Plasma protease C1 inhibitor</i>	[112-114]
Calicreína 5	Proteases serínicas	Secretada/ extracelular	AcetilLeupeptina/rev Antitrombina/rev	Serpina C1 <i>Plasma protease C1 inhibitor</i>	[106, 112, 113]
Calicreína 6	Proteases serínicas	Secretada/ extracelular	AcetilLeupeptina/rev Antitrombina/rev	Serpina C1 <i>Plasma protease C1 inhibitor</i>	[112, 113, 115]
Calicreína 7	Proteases serínicas	Secretada/ extracelular	AcetilLeupeptina/rev Antitrombina/rev	Serpina C1 <i>Plasma protease C1 inhibitor</i>	[106, 112, 113]
Calicreína 8	Proteases serínicas	Secretada/ extracelular	AcetilLeupeptina/rev Antitrombina/rev	SerpinaC1 <i>Plasma protease C1 inhibitor</i>	[106, 112, 113]
Calicreína B Plasmática	Proteases serínicas	Secretada/ extracelular	Aprotinina/rev	Alpha-2-macroglobulina Serpina C1	[106, 112]
Calicreína-7 Glandular	Proteases serínicas				[106]
Calpaína 1	Proteases cisteínicas	Citoplasma	Antipaína/rev Leupeptina/rev	Alpha-2-macroglobulina	[106, 116], [116, 117]
Calpaína 2, grande subunidade	Proteases cisteínicas	Citoplasma	Antipaína/rev Leupeptina/rev	Alpha-2-macroglobulina	
Carboxipeptidase E	Metaloprotease	Secretada/ extracelular	Ca ²⁺ /rev diisopropilfluorofosfato/rev		[112, 119]

Caspase-14	Proteases cisteínicas	Secretada/ extracelular	cIAP1/rev cIAP2/rev		[120, 121]
Catepsina B	Proteases cisteínicas	Lisossoma	Antipafina/ver Cistatina B/ver	Alpha-2-macroglobulina Cistatina A, B, C, D, S, SN	[106, 112]
Catepsina C	Proteases cisteínicas	Lisossoma	Cistatina E/rev		[106, 112]
Catepsina D	Protease aspártica	Lisossoma	Antipafina/ver Pepstatina-A/ver		[112, 122]
Catepsina G	Proteases serínicas	Secretada/ extracelular	Aprotinina/rev <i>Squamouscell carcinoma antigen 2</i>	Hurpina Alfa-2-macroglobulina Alfa-1-antiquimotripsina His-Pro-less <i>Antileukoproteinase</i> <i>Squamous cell carcinoma antigen 2</i>	[106, 112, 123]
Catepsina L	Proteases cisteínicas	Lisossoma	<i>Squamouscell carcinoma antigen 1</i>	Cistatina A, B, C, D, S, SN <i>Squamous cell carcinoma antigen 1</i> Hurpina	[106, 112] [124]
Catepsina Z	Proteases cisteínicas	Lisossoma	Cistatina E/rev		[106, 112]
Dipeptidilpeptidase 4, fórmula solúvel	Proteases serínicas	Membrana celular	Cistatina A/ver Puomicina/ver	Cistatina B	[106, 112]
Elastase-2A	Proteases serínicas		Aprotinina/rev Leupeptina/rev		[106, 112]
Furina	Proteases serínicas	Membrana celular	Histatina 5/rev		[106, 112]
Haptoglobina	Proteases serínicas (homólogo)	Secretada/ extracelular			[106]
<i>insulin-degrading enzyme</i>	Metaloprotease	Citoplasma/ membrana celular/ Secretada/ extracelular	<i>Peptidehydroxamic acid</i>		[106, 125]
Mieloblastina	Proteases serínicas	Secretada/ extracelular	α 2-Macroglobulina		[112, 117]
MMP 7	Metaloprotease	Secretada/ extracelular	TIMP-4		[106, 112]
MMP 8	Metaloprotease	Secretada/ extracelular	TIMP-4		[112, 126]
MMP 9	Metaloprotease	Secretada/ extracelular	TIMP-4		[112, 127]
MMP-1	Metaloprotease	Secretada/ extracelular	TIMP-4		[112, 128]
MMP-2	Metaloprotease	Secretada/ extracelular	TIMP-4		[112, 129]
<i>Proline iminopeptidase</i>		Citoplasma/ extracelular	EDTA		[106, 130, 131]

Prostasina, cadeia pesada	Proteases serínicas	Membrana/ Secretada/ extracelular	Aprotinina/rev		[106, 132]
Protease lasA	Metaloprotease	Membrana	EDTA/rev		[107, 133]
Proteossoma,	Protease treonínica	Citoplasma/ núcleo	Lactacistina/irrev		[106, 134]
Puomicina-sensível aminopeptidase	Metaloprotease	Citoplasma/ núcleo	EDTA/rev		[107, 135]
Tripeptidil-peptidase I	Proteases serínicas	Lisossoma	<i>Iodoacetamide</i> Diisopropilfluorofosfato/rev		[112, 136]
Tripsina 3	Proteases serínicas	Secretada/ extracelular	Aprotinina/rev Antipaina/rev	Alfa-1-antitripsina <i>Antileukoproteinase</i> ; Serpina 1	[107, 112]
Tripsina-1	Proteases serínicas	Secretada/ extracelular	Aprotinina/rev Antipaina/rev	Alfa-2-macroglobulina <i>Antileukoproteinase</i> <i>Kunitz-type protease inhibitor 2</i> ; SPINT 1; Serpina C1	[107, 112]
Trombina, cadeia pesada	Proteases serínicas	Secretada/ extracelular	Aprotinina/rev Antipaina/rev	Serpina C1	[106, 112]

Da análise da Tabela 2 conclui-se que a saliva é um sistema complexo e rico em proteases sendo as famílias mais abundantes as catepsinas, calicreínas, e MMPs (Tabela 2). Estas proteases encontram-se sob uma regulação estreita por parte de inibidores contribuindo assim para a estabilidade deste biofluido. Como se pode verificar, os inibidores da família das cistatinas e das serpinas existem em grande quantidade na saliva contribuindo para a regulação da atividade proteolítica pela inibição de catepsinas. As catepsinas são uma família de proteases globulares presentes no lisossoma, maioritariamente da classe mecanística das proteases cisteínicas. Inicialmente, o nome “catepsina” surgiu para descrever todo o grupo de peptidases que atuasse a nível intracelular, contudo, algumas catepsinas também apresentam funções a nível extracelular [137], como por exemplo a catepsina K, que atua na reestruturação do osso [138]. A principal função destas enzimas consiste no *turnover* proteico no interior do lisossoma, ou seja, as catepsinas são responsáveis por manterem o equilíbrio entre a quantidade de enzima produzida e a quantidade de enzima degradada neste organelo [139]. As catepsinas quando se encontram num meio exterior à célula continuam a ter a capacidade de degradar proteínas na matriz extracelular. Células tumorais libertam catepsinas para que estas degradem a matriz extra celular, permitindo a metástase do tumor. Uma forma de avaliar a progressão de tumores (p.e. cancro mama) é verificar se existe aumento dos níveis de catepsinas B e L [140]. A esta família de proteases pertencem aproximadamente doze membros, que se distinguem entre si pela sua estrutura, mecanismo catalítico, e proteínas alvo. Quando são produzidas, as catepsinas apresentam uma sequência extra de aminoácidos que inativam o centro ativo da enzima sendo esta estrutura designada de procatepsinas [141]. Quando a procatepsina atinge o interior do lisossoma, o ambiente ácido ativa a enzima por perda da sequência de aminoácidos. Esta perda da sequência de aminoácidos pode ocorrer por processos de autólise ou por clivagem por outra catepsina [142]. Dentro desta família existem proteases como a catepsina B que apresentam uma especificidade alargada, enquanto em outros casos como a catepsina L, apresentam uma sequência alvo bastante específica (resíduos hidrofóbicos em P₂ e resíduos polares em P₁) [143]. Apesar das catepsinas serem maioritariamente endopeptídases (clivam a cadeia peptídica no seu interior), algumas apresentam-se como carboxi ou aminopeptidases (clivam a cadeia peptídica junto dos seus resíduos terminais) [144].

A catepsina D é uma enzima codificada pelo gene *CTSD* [145] e é a maior responsável pela atividade proteolítica que ocorre no lisossoma. Esta enzima encontra-se nos lisossomas de vários tecidos. Embora a sua expressão varie consoante o tipo de célula também é possível encontrar catepsina D nos endossomas de alguns tipos específicos de células como macrófagos e hepatócitos [146]. Diversos estudos indiciam o envolvimento da catepsina D lisossomal na proteólise de enzimas intra e extracelulares enquanto a catepsina D endossomal é responsável pelo ataque proteolítico a antígenos estranhos, prohormonas, entre outras [147]. Apesar da Catepsina D ser importante uma expressão exagerada desta enzima leva a complicações como inflamações, progressão tumoral, e muitas outras complicações [148].

As calicreínas são um subgrupo de proteases serínicas. Estas enzimas exercem papéis fundamentais na regulação de vários processos patológicos e fisiológicos relacionados com o controlo da pressão arterial, homeostasia glicolítica, processos inflamatórios e muitos outros [149, 150]. Estas enzimas têm vindo a ser muito estudadas devido às suas potencialidades como biomarcadores, mais especificamente na área do cancro [151, 152]. Existem dois tipos distintos de calicreínas, as plasmáticas e as existentes nos tecidos. Enquanto que a calicreína plasmática humana (*KLKB1*) é o único exemplar conhecido deste subgrupo, no caso do subgrupo das calicreínas existentes nos tecidos são conhecidos cerca de quinze tipos distintos destas proteases (*KLK1*, *KLK2*, ..., *KLK15*). Tal como a maioria das proteases, as calicreínas são sintetizadas na forma de precalicreína, um precursor inativo, sendo posteriormente ativadas por outras enzimas como calicreínas ou fator Xiii, entre outras [153]. As cininas (bradicina, calidina e Met-Lys-bradicina) são oligopéptidos sintetizados no plasma ou líquido intersticial, e são originadas a partir da ativação, por ação das calicreínas, de proteínas de elevado peso molecular (cininogéneos). Estes oligopéptidos são responsáveis por vários eventos biológicos tais como, modulação da dor, contração e relaxamento muscular, pressão arterial [154]. Devido à sua função, as cininas apresentam-se sob uma regulação altamente controlada, pois para além da sua ativação por parte das calicreínas estas são rapidamente inativadas por enzimas como cininases I e II que se encontram distribuídas pelo plasma e pelos tecidos, conduzindo a um tempo de meia-vida extremamente curto das cininas. A compreensão destes mecanismos e a sua regulação através de processos de autólise, presença de inibidores, e outros, é de extrema importância, uma vez que, estes processos são constantes no corpo humano e

responsáveis por diversas patologias, podendo vir a permitir a compreensão e descoberta de novas abordagens para combate a essas patologias.

1.5.4. Inibidores de enzimas

A ocorrência de uma degradação descontrolada das proteínas dos tecidos celulares, causada pelos fenómenos de proteólise, seria catastrófica para a célula e para o organismo. Por esta razão torna-se necessário que as enzimas proteolíticas se encontrem sob regulação celular. A regulação destas enzimas é efetuada de diversas formas: controlo da síntese de proteases, ativação de formas zimogénias (ou proenzimas) e degradação destas enzimas e substratos. As proteases na sua forma “ativa” podem ser reguladas por fatores como, pH, iões cálcio, ATP e inibidores [155].

Os inibidores de proteases apresentam um papel fulcral em vários tipos de estudos bioquímicos, essencialmente ao nível das culturas de células e de purificação de proteínas. Uma vez que, a existência de proteases no interior das células é comum a todas as células vivas e que após degradação da célula as proteases são libertadas para o meio e rapidamente começam a degradar as proteínas, a adição de inibidores é importante, pois estes vão ligar-se às proteases, impedindo a degradação da amostra por parte das mesmas [156]. Existem vários tipos de inibidores de proteases e estão normalmente agrupados com base no seu mecanismo reacional, origem e similaridade estrutural. Estes podem ser agrupados em três grupos distintos: i) aqueles que reagem com mais do que uma classe de proteases; ii) aqueles que são específicos para apenas uma das classes de proteases e, iii) aqueles que são específicos para apenas uma protease [157]. Geralmente as proteases ligam-se aos seus substratos num ponto específico à superfície da enzima (centro ativo), com a ligação peptídica a quebrar sob a maquinaria catalítica e com as cadeias laterais a ocuparem posições específicas relativamente ao centro ativo. Este tipo de conhecimento permite a criação de inibidores sintéticos, que utilizam esta propriedade para ligarem um grupo designado “*warhead*”, que irá reagir com o centro ativo, inativando assim a protease [158].

1.5.4.1. Tipos de Inibição

Quando ocorre a ligação entre uma enzima e um inibidor, este inibidor pode interagir com a enzima de forma a criar um complexo de inibição reversível ou irreversível. Na inibição irreversível, tal como o próprio nome indica, após ligação entre o

inibidor e a enzima, a enzima perde definitivamente a sua atividade catalítica. Os inibidores irreversíveis ligam-se fortemente à enzima de forma a não se separar desta, inativando-as completamente e definitivamente sendo por esse motivo designados, de inativadores [159], ou inibidores suicidas [160]. Na inibição reversível, o inibidor liga-se à enzima criando interações não-covalentes como, pontes de hidrogénio, interações hidrofóbicas ou ligações iónicas. Várias ligações fracas permitem ligar o inibidor ao centro ativo da enzima dando origem a uma ligação forte e específica. Contrariamente ao que acontece com substratos e inibidores irreversíveis, estes inibidores são facilmente removidos por diluição ou diálise [161]. Com base no local e na forma como ocorre ligação entre o inibidor e a enzima alvo, é possível dividir o processo de inibição em três tipos de inibição: competitiva, não competitiva e acompetitiva [162].

Um inibidor competitivo apenas se liga à enzima na sua forma livre, e esta ligação acontece no centro ativo precisamente no mesmo local de ligação do substrato. No entanto, isto não acontece com todos os inibidores competitivos sendo mais correto afirmar que a ligação de um inibidor competitivo e a ligação do substrato são eventos mutuamente exclusivos. Verifica-se que na inibição competitiva quanto maior for a concentração de inibidor menor vai ser a velocidade de reação, o que leva a um aumento do K_m , pois no final grande parte do substrato encontra-se inalterado. Neste tipo de inibição o valor de K_m aumenta, mas a velocidade máxima (V_{max}) permanece inalterada (Figura 3) [163]. Por vezes a inibição pode ser superada, pois em concentrações de substrato mais elevadas, constata-se um aumento da constante de inibição (K_i). Esta característica influencia a eficácia fisiológica apresentada por algumas drogas. De facto, quando uma enzima é inibida por um inibidor competitivo, verifica-se um aumento da concentração local de substrato e o inibidor vai perdendo a sua eficiência. No caso dos inibidores não-competitivos isto não acontece [164].

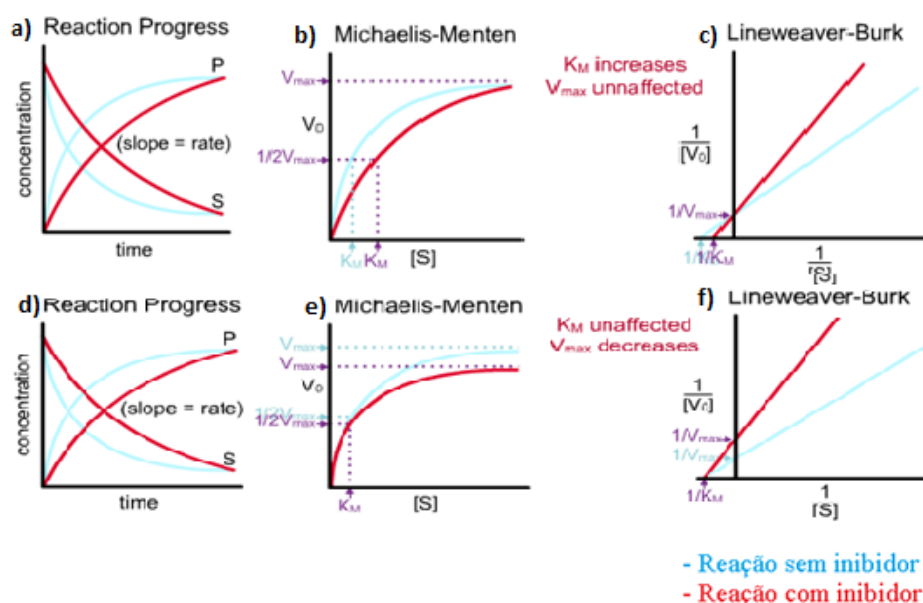


Figura 3 - a) Comparação do progresso da reação entre reação na presença e ausência de inibidor competitivo; b) diferenças no gráfico de Michaelis-Menten na presença e ausência de um inibidor competitivo; c) diferenças na linearização Lineweaver-Burk entre a reação enzimática na presença e ausência de um inibidor competitivo d) comparação do progresso da reação entre reação na presença e ausência de inibidor não-competitivo; e) diferenças no gráfico de Michaelis-Menten na presença e ausência de um inibidor não-competitivo; f) diferenças na linearização Lineweaver-Burk entre a reação enzimática na presença e ausência de um inibidor não-competitivo.

Na inibição não-competitiva, o inibidor não-competitivo tanto se liga à enzima na sua forma livre como ao complexo enzima-substrato. Este evento de ligação do inibidor ocorre num local específico de ligação que não o centro ativo da enzima. Contrariamente ao que acontece na inibição competitiva, um inibidor não-competitivo irá diminuir o valor da velocidade máxima (V_{max}), mas não interfere com o valor da constante de Michaelis (K_M) e a constante de inibição (K_i) não varia com o aumento da concentração de substrato [165]. Existem situações na qual um inibidor apresenta afinidade, tanto para o centro ativo da enzima como para o centro alostérico. A esta mistura de inibição competitiva com inibição não competitiva dá-se o nome de inibição mista.

1.5.4.2. Tipos de inibidores

São considerados inibidores de proteases não-específicos aqueles que atuam em várias enzimas de classes distintas e não apenas numa classe específica de proteases. Os inibidores não-específicos de proteases podem ser divididos em quatro grupos distintos: as

α -Macroglobulinas, péptidos aldeídicos, péptidos com grupos clorometil cetonas, e metais quelantes.

As α -Macroglobulinas são um grupo de proteínas de elevado peso molecular, que se ligam e inibem um grande número de endopeptidases. Faz parte deste grupo específico a proteína humana α_2 M, cuja capacidade inibitória resulta de uma alteração conformacional seguida de uma reação com a endopeptidase o que “armadilha” fisicamente a enzima impedindo-a de reagir [166]. Assim, verifica-se que a α_2 M apresenta um mecanismo de ação que não envolve ligação direta ao centro ativo da protease como a maioria dos inibidores. A α_2 M inibe as proteases irreversivelmente, contudo, a enzima continua a apresentar atividade catalítica em péptidos de pequenas dimensões. No entanto, em péptidos de dimensões superiores a 28kDa apresenta-se praticamente inativa. Esta particularidade resulta do impedimento estérico que a protease apresenta quando ligada à molécula de α_2 M [166].

Outro tipo de inibidor não-específico são os péptidos aldeídicos. Estes péptidos são constituídos por uma cadeia de aminoácidos e apresentam uma substituição do grupo α -carboxilato por um grupo aldeído [167]. Estes inibidores são geralmente reversíveis e são referidos como “análogos de estado de transição”, uma vez que inibem a atividade da protease ao mimetizar o intermediário tetraédrico formado durante a hidrólise da ligação peptídica [168]. Devido à sua baixa toxicidade, à sua estabilidade em solução aquosa e capacidade em penetrar nas células estes inibidores têm sido largamente utilizados com o objetivo de evitar a ocorrência de proteólise em culturas de células [169], potenciando a sua utilização noutras aplicações. Os dois exemplos mais conhecidos desta família de inibidores não-específicos são a leupeptina e a antipapaína sendo capazes de inibir proteases serínicas e cisteínicas. Por exemplo, a leupeptina é capaz de inibir eficazmente a tripsina e a catepsina B, enquanto a antipapaína consegue inibir a tripsina e a calpaína [95, 170].

Uma das características das metaloproteases é a presença de íão metálico (frequentemente zinco), que participa na catálise polarizando as moléculas de água de forma a atacarem as ligações peptídicas do substrato [171]. Esta característica diferencia as metaloproteases, de outras proteases como calpaínas, cuja atividade pode ser estabilizada (não obrigatoriamente) pela presença de cálcio. Tanto as metaloproteases como algumas proteases serínicas estabilizadas por cálcio podem ser inibidas por agentes quelantes como

EDTA e EGTA [172]. Por vezes, elevadas concentrações de zinco (na ordem dos mM) também podem inibir metaloproteases. A inibição por zinco resulta muitas vezes da formação de mono hidróxido de zinco através da ligação do ião catalítico (zinco) à cadeia lateral do centro ativo da enzima [79] . Verifica-se então uma inibição competitiva entre o substrato e o inibidor. A inibição não-competitiva por outros iões metálicos acontece quando ocorre ligação dos iões metálicos a outros locais da enzima que não o centro ativo.

Contrariamente aos inibidores não-específicos, os inibidores específicos de proteases apenas atuam em enzimas pertencentes a uma única família de proteases. Estes inibidores são então divididos com base na família de proteases na qual atuam, tais como, inibidores de proteases serínicas, proteases cisteínicas, metaloproteases e proteases aspárticas. No caso dos inibidores específicos de proteases serínicas, estes podem ser divididos em vários grupos, uma vez que existem vários tipos de moléculas distintas que permitem a diminuição da sua atividade. Estes inibidores podem ser organizados com base nas suas características da seguinte forma: organofosfatos, fluoretos de sulfonil, cumarinas, péptidos de ácido borónico e proteínas inibidoras de proteases serínicas.

As proteínas inibidoras de proteases serínicas podem ser divididas em alguns grupos de acordo com vários esquemas. Dentro deste tipo destacam-se os inibidores *kunitz* de tripsina, como por exemplo a aprotinina. Estes inibidores atuam formando um complexo forte mas reversível entre a protease e o inibidor, embora existam inibidores de elevado peso molecular em que a sua reversibilidade é difícil de demonstrar (serpinas). As proteínas inibidoras de proteases *in vitro* apresentam baixa seletividade, embora *in vivo* o mesmo não seja esperado [173]. A aprotinina é um inibidor específico de proteases serínicas, capaz de inibir enzimas como a tripsina, quimiotripsina e proteases relacionadas [112]. Esta proteína foi muito utilizada como forma de reduzir a hemorragia em cirurgias complexas como cirurgias ao coração e fígado, em que a aprotinina diminuía a ocorrência da fibrinólise (processo através do qual um coágulo sanguíneo é destruído) e consequentemente a necessidade de transfusões sanguíneas durante o procedimento cirúrgico. Em 2008 o uso da aprotinina em cirurgias foi proibido depois de vários estudos terem associado a utilização desta a eventuais riscos pós-operatórios e até mesmo à morte [174]. Esta proteína é proveniente de tecido pulmonar de bovino, apresentando um peso molecular de 6511,51g/mol e uma cadeia de 58 aminoácidos na forma de polipéptido globular [175-177]. Este polipéptido é bastante estável devido à presença de 3 pontes

dissulfureto (Cys5-Cys55, Cys14-Cys38 e Cys30-Cys51) [177]. Como já foi referido, a aprotinina apresenta uma estrutura terciária bastante estável, o que permite evitar a sua desnaturação a temperaturas relativamente elevadas, pHs ligeiramente ácidos ou alcalinos, na presença de solventes orgânicos e até mesmo evitando a degradação proteolítica [178]. Quando em pHs extremos, inferiores a 3,2 ou superiores a 10, verifica-se a quebra dos complexos aprotinina-protease [179].

Os inibidores específicos das proteases cisteínicas podem ser organizados em cinco categorias distintas, sendo elas, péptidos sintéticos de diazometano, péptidos epóxidos, fluorometil cetonas, alciloxi-metil cetonas e proteínas inibidoras, conhecidas por cistatinas. As cistatinas são inibidores reversíveis que se ligam fortemente e exclusivamente às proteases cisteínicas da família da papaína. Uma das razões que explica a não inibição de outras famílias de proteases por parte das cistatinas é o facto de as cistatinas inibirem as proteases com base na criação de uma estrutura tridimensional, que impede o substrato de se ligar à enzima impossibilitando a enzima de realizar a sua atividade catalítica [180].

Os inibidores de metaloproteases são específicos atuando apenas em proteases da classe das metaloproteases. Este tipo de inibidores está dividido em dois grupos de inibidores: peptídicos e proteicos. Os inibidores peptídicos específicos de metaloproteases são compostos que procuram atuar sobre a protease de forma a que um agente quelante reaja com o átomo catalítico da enzima (usualmente zinco) de forma a inativá-la. Por esta razão, geralmente estes inibidores apresentam um grupo que lhe permite obter propriedades quelantes. Estes grupos podem ser, grupos carboxílicos [181], grupos tiol [182], entre outros. Este grupo fica então ligado a uma cadeia de tamanho particular de forma a conseguir aceder ao centro ativo da metaloprotease de interesse. Para terminar o grupo dos inibidores específicos, temos os inibidores específicos das proteases aspárticas (pepsina, catepsina D...) [183], neste conjunto de inibidores está inserida a pepstatina-A (inibidor altamente conhecido e estudado). Este inibidor é um pentapéptido de cadeia *Isovaleryl-Val-Val-Sta-Ala-Sta*, e apresenta na sua constituição dois resíduos de um aminoácido incomum, a estatina [ácido 3S,4S-4-amino-3-hidroxi-6-metil heptanóico] [184]. A pepstatina apresenta uma constante de inibição para a pepsina de $4,5 \times 10^{-11}$ M [185] e para a renina de $1,3 \times 10^{-10}$ M [186], mostrando com estes valores a sua elevada eficácia como inibidor. Vários estudos têm sido realizados de forma a modificar a estrutura da pepstatina, procurando obter uma seletividade maior para diferentes proteases aspárticas

[76]. Um grande número de trabalhos tem sido realizado no sentido de criar um inibidor biodisponível, eficaz e seletivo para proteases do vírus HIV [187].

1.6. Objetivos

As proteases apresentam um papel fulcral na manutenção da homeostasia dos organismos e o seu mau funcionamento/desregulação pode levar a um desequilíbrio, podendo levar à origem de diversas patologias. Devido às suas características: i) modelo de atuação em cascata, ii) ocorrência de autólise e iii) baixa concentração nas amostras, o estudo das proteases é ainda limitado. Por esta razão, este trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema simples e eficaz com base em nanopartículas magnéticas acopladas a inibidores específicos de proteases que permita a caracterização de proteases. De forma a alcançar o objetivo principal, os objetivos secundários são:

- a) Síntese, funcionalização de nanopartículas magnéticas e acoplamento de inibidores;
- b) Caracterização de proteases presentes em biofluidos com o sistema de nanopartículas magnéticas@inibidores.

2. Material e Métodos

2.1. Reagentes

Os reagentes utilizados em todo o procedimento experimental, encontram-se abaixo.

Nome	Fórmula Química	Abreviatura
1-Propanol	C ₃ H ₈ O	
3-aminopropil trietoxissilano	C ₉ H ₂₃ NO ₃ Si	APTES
Ácido acético glacial	C ₂ H ₄ O ₂	
Ácido etilenodiaminotetraacético	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	EDTA
N-(Trimetoxissililpropil)-etilenodiaminatriacetato de sódio	C ₁₄ H ₂₅ N ₂ Na ₃ O ₉ Si	EDTA-TMS
Ácido nítrico	HNO ₃	
Acrilamida	C ₃ H ₅ NO	
Aprotinina de pulmão de bovino		
Azul bromofenol		
Bicina	C ₆ H ₁₃ NO ₄	
Bisacrilamida	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂	
Citrato de Sódio	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇	
Cloreto de ferro (II) tetra-hidratado	Cl ₂ Fe.4H ₂ O	
Cloreto de Ferro (III) hexa-hidratado	Cl ₃ Fe.6H ₂ O	
<i>Coomassie brilliant blue g250</i>		
Dodecil de sulfato de sódio	NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	SDS
Gelatina		
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	
Hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida	C ₈ H ₁₇ N ₃	EDC
Hidróxido de amônio	NH ₄ OH	
Hidróxido de sódio	NaOH	
Mercaptoetanol	C ₂ H ₆ SO	
N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina	C ₆ H ₁₆ N ₂	TEMED
N-hidroxisuccinimida	C ₄ H ₅ NO ₃	NHS
Ninidrina	C ₉ H ₆ O ₄	
Persulfato de amônio	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	
Tampão fosfato pH 7,4 - PBS		
Tetraetil Orto-silicato	SiC ₈ H ₂₀ O ₄	TEOS
Trietilamina	C ₆ H ₁₅ N	
Tris-HCl, solução tampão a pH 6,5 conc 0,5M		
Tris-HCl, solução tampão a pH 8,8 conc 1,5M		
Triton X-100	C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n	

2.2. Procedimento experimental

Neste trabalho foi desenvolvido um procedimento experimental com o objetivo de sintetizar e funcionalizar NPs magnéticas segundo diferentes estratégias, visando assim a aplicação das NPs funcionalizadas para enriquecimento de proteases de amostras biológicas.

2.2.1. Síntese das Nanopartículas, funcionalização e acoplamento a inibidores

De forma a facilitar a compreensão da metodologia experimental encontra-se representado na Figura 4 um esquema resumo das várias etapas envolvidas na preparação das nanopartículas. Os resultados experimentais obtidos serão também apresentados com base neste esquema.

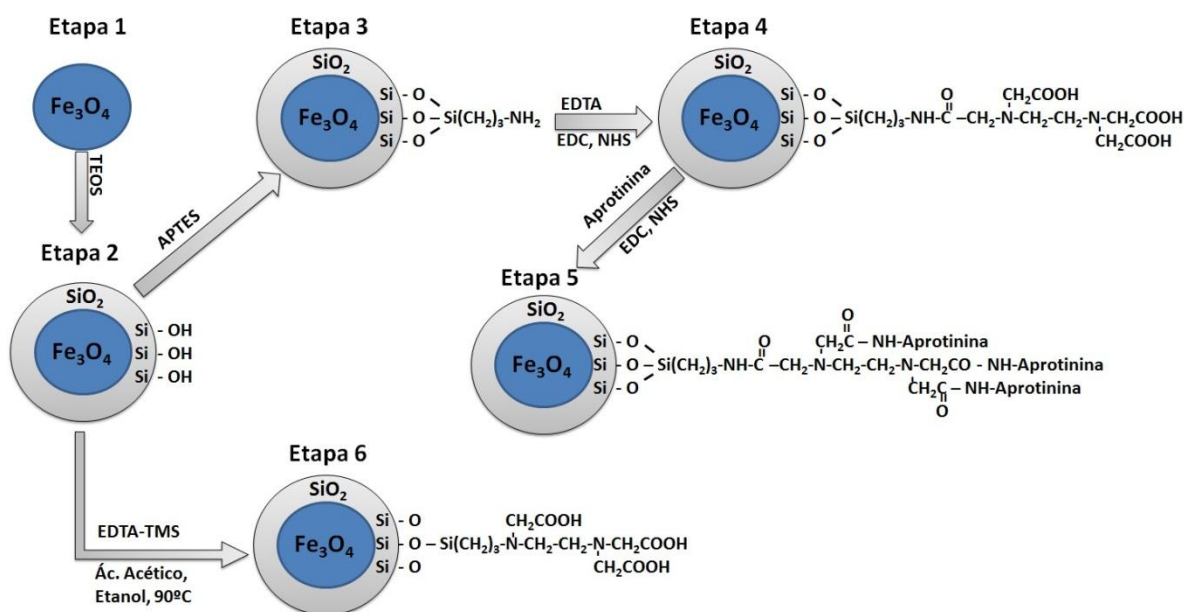


Figura 4 - Esquema da divisão do trabalho por etapas

A **síntese das nanopartículas** de magnetite – Fe_3O_4 (etapa 1) realizou-se pelo método da co-precipitação de FeCl_2 e FeCl_3 (razão molar - 1:2) em condições alcalinas, à temperatura ambiente e atmosfera inerte. Posteriormente, as NPs foram estabilizadas com citrato de sódio de forma a evitar a sua aglomeração em solução [188, 189].

- **Síntese das nanopartículas de magnetite (Fe_3O_4) - Etapa 1**

Num balão de 250 ml com 190 ml de água destilada, adicionou-se 4,43 g de cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e deixou-se a borbulhar em corrente de azoto durante algum tempo de forma a retirar o oxigénio em solução. De seguida, adicionou-se 1,625g de cloreto de ferro (II) tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e também 10 ml de hidróxido de amónio (NH_4OH), e deixou-se reagir durante 10 minutos à temperatura ambiente e sob agitação mecânica. Após síntese da magnetite, lavaram-se as partículas três vezes, com água destilada e com auxílio da separação magnética

- **Estabilização da magnetite**

Para estabilização das nanopartículas, lavou-se com ácido nítrico (HNO_3) 2M e consequente separação magnética. De seguida, adicionou-se água e acertou-se o pH com hidróxido de sódio (NaOH) até aproximadamente pH 2,5. Por fim, adicionou-se 5ml de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 0,5M e deixou-se reagir durante 1h. Após estabilização lavaram-se as nanopartículas com água e levou-se a liofilizar.

As nanopartículas de magnetite foram revestidas com uma capa de **sílica amorfa** – SiO_2 (etapa 2), com o objetivo de prevenir a sua aglomeração e garantir também a sua estabilidade química evitando a sua oxidação. O revestimento com sílica tem também como objetivo a criação de uma plataforma para posterior funcionalização e modificação superficial [190, 191]. A silanização das partículas foi realizada pela hidrólise do tetraetil ortosilicato (TEOS) em condições alcalinas utilizando trietilamina como catalisador [188]. As nanopartículas de magnetite revestidas com uma capa de sílica foram funcionalizadas segundo duas estratégias distintas.

- **Silanização – Etapa 2**

Para proceder a silanização, suspendeu-se 100 mg de magnetite em 18 ml de água e deixou-se a sonicar durante 10 minutos em gelo. De seguida, adicionou-se tetraetil ortosilicato (30%v/v em etanol) e adicionou-se 0,1 ml de trietilamina e sonicou-se durante 15 minutos. Por fim, lavaram-se as partículas com água e separaram-se magneticamente e levaram-se a liofilizar.

A primeira (etapa 3,4 e 5) consistiu no acoplamento da Aprotinina (inibidor) à superfície das NPs magnéticas. Para tal a superfície das nanopartículas silanizadas foi primeiro **funcionalizada com grupos amina –NH₂** (etapa 3b), através da reação com (3-aminopropil) trietoxissilano (APTES), conferindo maior reatividade à superfície e diminuindo interações não específicas com proteínas [192, 193]. De seguida introduziram-se **grupos carboxilo – COOH** (etapa 4) na superfície das NPs. Esta funcionalização foi realizada via ativação carbodiimida utilizando EDC e NHS, em que os grupos amina das NPs se ligam covalentemente aos grupos carboxilo do EDTA [194]. O composto EDTA foi selecionado precisamente por conter na sua estrutura um elevado número de grupos funcionais – COOH. Finalmente, procedeu-se à **imobilização da aprotinina (etapa 5)**, fazendo-a reagir com as NPs pela via de ativação carbodiimida, através da reação dos grupos carboxilo das NPs com o terminal amina da aprotinina [194].

- **Funcionalização com NH₂ – Etapa 3**

De forma a vetorizar as nanopartículas com terminais amina (-NH₂), lavou-se as partículas com 1-propanol, de seguida adicionou-se com APTES (0,1 ml por 30mg de partículas) e deixou-se em agitação durante 12 horas. Posteriormente lavou-se com água desionizada e liofilizou-se.

- **Funcionalização com EDTA (ligação amida) – Etapa 4**

Solução 1: Adicionou-se 20mg de EDC e 25mg de NHS a 100mg de EDTA em 5ml de água destilada e homogeneizar.

Nota: os cross-linkers (EDC e NHS) devem ser adicionados à solução que contém os grupos carboxilo (-COOH) de forma a ativa-los.

Solução 2: Dispersou-se 70mg de nanopartículas em 10ml de água destilada.

Por fim, adicionou-se a solução 1 à solução 2 e acidificou-se até pH 4,5 e deixou-se em agitação durante 24 horas. Por fim, lavou-se e levou-se a liofilizar [194].

- **Imobilização de aprotinina (ligação amida) – Etapa 5**

Solução 1: Adicionou-se 20 mg de EDC e 25 mg de NHS a 70mg de partículas e dispersou-se em 10 ml de água destilada.

Nota: os cross-linkers (EDC e NHS) devem ser adicionados à solução que contém os grupos carboxilo (-COOH) de forma a ativa-los.

Solução 2: Dissolveram-se 2mg de nanopartículas em 5ml de água destilada.

Por fim, adicionou-se a solução 1 à solução 2 e acidificou-se até pH 4,5 e deixou-se em agitação durante 24 horas. Por fim, lavou-se e levou-se a liofilizar.

A segunda estratégia de funcionalização (etapa 6) consistiu na introdução de grupos – COOH com ação quelante na superfície das NPs e visa a aplicação das NPs no enriquecimento de metaloproteases. Para tal, as NPs foram funcionalizadas com EDTA modificado (EDTA-TMS). A reação decorreu em meio ácido, com base no protocolo desenvolvido por Ding *et al.* [195].

- **Funcionalização com EDTA-TMS – Etapa 6**

Dispersaram-se 80mg de nanopartículas em 2,5ml de água e adicionaram-se 3 ml (1 ml de EDTA-TMS em 2ml de água desionizada). De seguida adicionaram-se -se 50µl de ácido acético glacial e deixou-se em agitação mecânica a 90°C durante 18 horas.

2.2.2. Quantificação de proteína

A **quantidade de aprotinina** existente em cada amostra foi quantificada pelo método RC-DC (Bio-rad). A quantidade de aprotinina imobilizada na superfície das NPs foi calculada pela diferença entre a quantidade de aprotinina na amostra inicial e a quantidade de aprotinina no sobrenadante de incubação.

- **Quantificação Proteína – RC-DC**

Retirou-se 5µL de amostra para um eppendorf, e adicionou-se 125µL de reagente 1 e levou-se ao vórtex. De seguida, adicionou-se 125µL de reagente e levou-se ao vórtex novamente, após este procedimento, centrifugaram-se as amostras a 15000g durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante (sem recorrer à micropipeta). Repetiu-se o procedimento anterior em que se adicionou 125µL de reagente 1 e levou ao vórtex e 40µL de reagente 2 e levou-se ao vórtex novamente, de seguida centrifugou-se durante 5 minutos a 15000g e descartou-se o sobrenadante (novamente sem recorrer à micropipeta). De seguida as amostras foram secas na Speevac. Após as amostras estarem secas adicionou-se 50µL de reagente A' e levou-se ao vórtex e seguidamente adicionou-se 400µL de reagente B e levou-se ao vórtex. Por fim, deixou-se reagir durante 15 minutos à temperatura ambiente e leu-se a absorvância de 200µL a 750nm.

- **Preparação de A'**

Juntar 1ml de Reagente A a 20µL de reagente S.

2.2.3. Incubação das NPs com biofluidos

Os biofluidos foram pré-tratados com base em protocolos estabelecidos para o tratamento das amostras em causa. Os biofluidos foram obtidos de indivíduos saudáveis. A saliva não estimulada foi coletada em jejum para tubos de recolha previamente arrefecidos no gelo. As amostras de saliva foram centrifugadas a 12000g durante 30 minutos a 4°C [196]. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C até análise.

Para incubação das NPs com os biofluidos (saliva) foram suspensas 1,5 mg de NPs em 500µl de biofluido já pré-tratado, e deixou-se sob agitação mecânica à temperatura ambiente durante 4 horas. As NPs foram separadas magneticamente, descartou-se o sobrenadante e lavaram-se (tampão Tris-HCl, pH 8,6) as NPs 3 vezes, de forma a tentar remover as proteínas ligadas à matriz (NPs) inespecificamente.

2.2.4. Separação de proteínas por SDS-PAGE

As proteínas presentes na matriz (NPs) foram separadas por um gel de eletroforese em condições desnaturantes. Para tal, foi preparado um gel de 15% *SDS-PAGE*, de forma a separar as proteínas pelo seu peso molecular. Após a corrida, o gel foi deixado a fixar durante 1 hora numa solução de 40% metanol, e de seguida deixado a corar *overnight* em solução de coomassie coloidal. Por fim, o gel foi descorado com solução 25% metanol de forma a remover o corante de fundo (*background*). As NPs foram fervidas em tampão de carga e seguidamente removidas magneticamente.

- **Gel de corrida (15%)**

De forma a preparar um gel de poliacrilamida 15% adicionou-se 3,4ml de ddH₂O, de seguida juntou-se 5ml de tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8, seguido de 7,29ml, 4,02ml e 0,2ml de acrilamida 40%, bis-acrilamida 2% e SDS 10%, respetivamente. Por fim, foram adicionados 0,1ml e 0,01ml de catalisadores c APS 10% e TEMED, respetivamente. Homogeneizou-se a solução e passou-se para as cassetes de corrida (Bio-rad) e deixou-se polimerizar à temperatura ambiente.

- **Gel de Carregamento (*do inglês Stacking Gel* – 4%)**

Adicionou-se 5,8ml de ddH₂O, seguido de 2,5ml de tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8, prontamente foram adicionados 0,97ml de acrilamida 40%, 0,54ml de bis-acrilamida 2% e 0,1ml de SDS 10%. Por fim, adicionou-se 0,05ml e 0,01ml dos catalisadores APS 10% e TEMED, respetivamente.

- **Tampão de carga**

Adicionou-se a 400µl de SDS 10%, de seguida adicionou-se 250 µl de Tris-HCl 0,5M pH 6,8, e adicionaram-se 150 µl e 200 µl de glicerol e mercaptoetanol, respetivamente. Por fim, adicionaram-se alguns pós de azul bromofenol.

- **Tratamento dos Géis após corrida**

Os géis foram deixados a fixar em solução de 40% metanol, 10% ácido acético em água, durante 1 hora sob agitação mecânica. De seguida, deixaram-se em coloração *overnight* com *coomassie colloidal*, e por fim deixaram-se a descorar em solução 25% metanol em água durante 2/3 horas.

2.2.5. Teste de atividade de metaloproteases por zimografia

Os ensaios zimográficos foram efetuados com base nos procedimentos descritos por Vitorino *et al.* [197]. Sucintamente, as proteínas ligadas às NPs foram separadas por gel 15% *SDS-PAGE*, em que o gel foi copolimerizado com gelatina. Após eletroforese, o gel foi lavado com uma solução 2,5% Triton X-100 e incubado a 37°C em tampão de desenvolvimento (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM CaCl₂, 10 mM ZnCl₂) *overnight*. De seguida, o gel foi corado com solução 0,5% m/v *Coomassie Brilliant Blue (CBB) G250*, durante 4 horas sob agitação mecânica e de seguida descorado com uma solução 40% metanol/10% ácido acético. Sendo a gelatina um substrato das metaloproteases (proteases-alvo), a zimografia permite observar a presença ou não de metaloproteases ligadas às NPs com bastante sensibilidade.

2.3. Instrumentação

2.3.1. Espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR)

O FTIR foi realizado com recurso a uma célula de reflexão atenuada total – do inglês “*attenuated total reflection*” – ATR. Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando um espectrofotómetro de infravermelho FT Mattson 7000, com célula Golden-Gate de reflexão única com cristal de reflexão total atenuada (ATR), para amostras sólidas.

Todos os espectros foram adquiridos com resolução de 4 cm⁻¹ e 256 varrimentos e com um intervalo de número de onda entre 4000-500 cm⁻¹.

2.3.2. Medição do Potencial Zeta

O potencial zeta das soluções de nanopartículas de magnetite foi medido utilizando o equipamento *Zetasizer Nanoseries*, da *Malvern Instruments*. As medições realizaram-se utilizando uma célula de plástico descartável, após medição dos valores de pH da solução.

2.3.3. Microscopia eletrónica de transmissão

As nanopartículas de magnetite foram analisadas por microscopia eletrónica de transmissão (TEM) utilizando um microscópio Hitachi H-9000, operado a 300kV. A preparação das amostras consistiu na deposição de uma gota de uma suspensão aquosa de nanopartículas, numa grelha de cobre revestida com carbono e deixando-se posteriormente evaporar o solvente.

2.3.4. Espetrometria de massa

Os espectros de massa foram obtidos utilizando um espectrómetro de massa de laser de adsorção/ionização de matriz assistida com tempo de voo MALDI-TOF/TOF (4800 *Proteomics Analyzer*, *Applied Biosystems*, *Foster City, CA, USA*) em modo positivo de refletor de iões e a coletar valores de massa entre 700-4500 Da com 800 disparos de laser.

2.3.5. Difração de raios-X

Os difratogramas de raios-X das nanopartículas foram obtidos num difractorímetro Rigaku Geigerflex Dmax X-ray equipado com fonte de radiação monocromática Cu Kr.

2.3.6. Digitalização de géis

As imagens dos géis foram obtidas utilizando um sistema Geldoc XR+ (Bio-rad) e processadas utilizando o software ImageLab® versão 3.0 (Bio-rad).

2.3.7. Medida da área superficial específica BET

A área superficial específica das NPs magnéticas foi determinada através do método BET de adsorção de azoto utilizando um equipamento Gemini Micromeritics.

2.3.8. SQUID

As medidas foram feitas num Magnetómetro da Quantum Design modelo MPMS-5s da Universidade do Porto, equipado com um *superconducting quantum interference device*. As medidas foram feitas a 300 K, com campos magnéticos desde 5×10^5 até -300 Oe.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização das nanopartículas magnéticas

Após a síntese das nanopartículas (NPs) de óxido de ferro - magnetite (Fe_3O_4) procedeu-se à sua caracterização de forma a avaliar as suas propriedades tais como o tamanho, a capacidade de dispersão no meio, a aglomeração, a silanização, entre outros. As técnicas de caracterização usadas foram a microscopia eletrónica de transmissão (TEM), a difração de raios-X (DRX), a medição da área superficial específica pelo método BET (*Brunauer Emmett Teller*), a espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR), tendo sido ainda efetuadas medições da carga à superfície (potencial zeta) e medidas de magnetização por SQUID. Estes estudos de caracterização foram realizados em todas as etapas do procedimento.

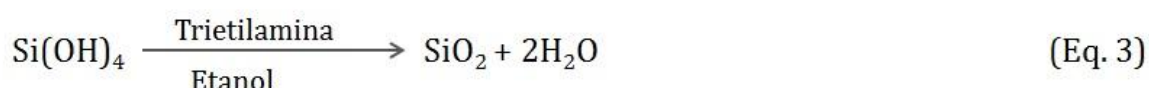
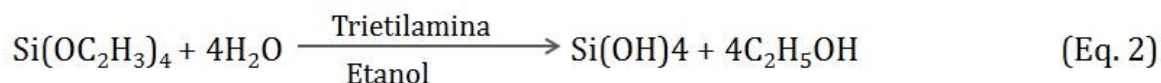
3.1.1. Síntese do núcleo magnético e revestimento com capa de sílica

A Figura 4 representa, sinteticamente, as várias fases da preparação das NPs, sendo que as etapas 1 e 2 correspondem à síntese do núcleo magnético (magnetite - Fe_3O_4) pelo método de co-precipitação e ao revestimento do núcleo magnético recorrendo à hidrólise de um orto-silicato (TEOS).

A formação da magnetite pelo método da co-precipitação dos iões Fe^{2+} e Fe^{3+} ocorreu segundo a reação (Eq. 1):



As equações 2 e 3 descrevem as reações químicas de hidrólise e condensação que ocorrem durante a formação do revestimento de sílica:



A silanização é um passo fundamental uma vez que protege o núcleo magnético da ação de agentes externos e, além disso, é responsável pela introdução de grupos silanol na

superfície das NPs necessários para prosseguir com as funcionalizações em estudo [198, 199].

Com o intuito de confirmar a obtenção de partículas de magnetite de tamanho reduzido e a sua silanização recorreu-se à técnica de difração de raios-X. Esta técnica possibilita a avaliação da estrutura cristalina das partículas, a qualidade da sua cristalinidade e permite também, estimar o tamanho médio das partículas (cristalites).

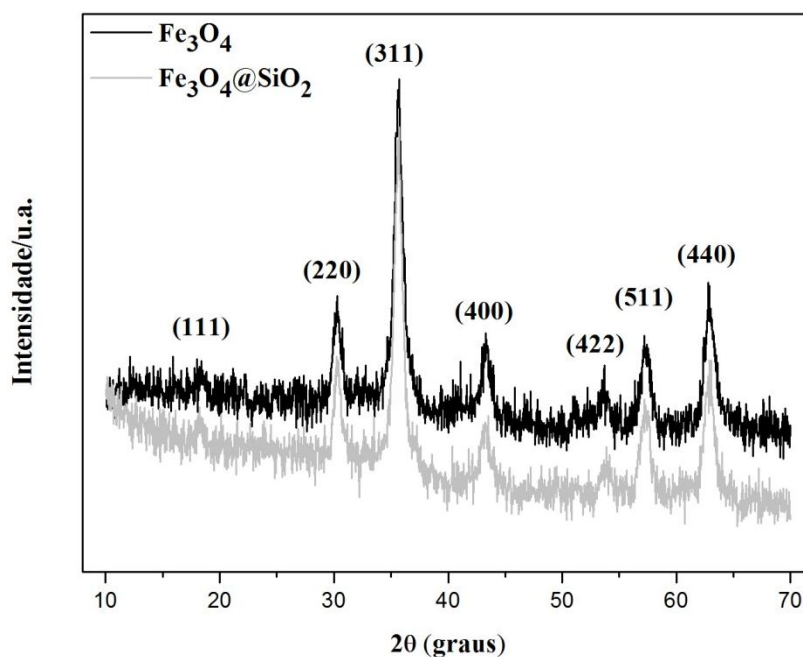


Figura 5 - Difratoograma de raios-X de magnetite antes e após silanização

O difratograma de raios-X obtido para as NPs de magnetite, antes e após silanização (Figura 5 e Tabela 3) valida a obtenção de magnetite cristalina pelo método da co-precipitação. Na Tabela 3 os valores de 2Θ estão indexados aos índices de Miller correspondentes à rede de planos da magnetite de estrutura cristalina cúbica (JCPDS 19-629) [200-202].

Tabela 3- Resultados de DRX da magnetite e magnetite silanizada

Índice de Miller	Ângulo (2Θ)
(111)	18,4°
(220)	30,1°
(311)	35,5°
(400)	43,2°
(422)	53,5°
(511)	57,0°
(440)	62,7°

A ausência de picos com valores para os ângulos 2Θ entre os 20° e os 30° , são indicadores da inexistência de maguemite (Anexo). Através da medição da largura a meia altura do pico (311) e aplicando da equação de *Scherrer* foi possível constatar que as partículas de magnetite obtidas têm um tamanho médio de 10-20nm [200, 204, 205]. Verificou-se também que os picos obtidos no difratograma possuem uma base alargada, podendo ser este um indicador de uma cristalização deficiente da magnetite, típica do método de co-precipitação [4, 204]. A magnetite foi a única fase cristalina identificada no difratograma obtido (Anexo). No caso das NPs silanizadas, uma vez que a capa protetora de sílica que envolve o núcleo magnético é amorfa, não era de esperar qualquer alteração no difratograma obtido. Como se pode verificar na Figura 5 estão presentes apenas os picos característicos referentes à estrutura cristalina da magnetite.

De seguida, de forma a avaliar a morfologia das NPs, recorreu-se à microscopia eletrónica de transmissão (TEM). As imagens de TEM (Figura 6 A e B) mostram que se obteve magnetite de morfologia esférica com diâmetro médio de $11,8\text{nm} \pm 3,2\text{nm}$ (calculado usando o programa imageJ, v1.46), valor que se encontra de acordo com os resultados obtidos por DRX. Nas imagens de TEM obtidas para as partículas silanizadas (Figura 6. C e D), verifica-se que foi possível revestir o núcleo magnético com uma capa de sílica amorfa com cerca de $4,9 \pm 1,5$ nm de espessura.

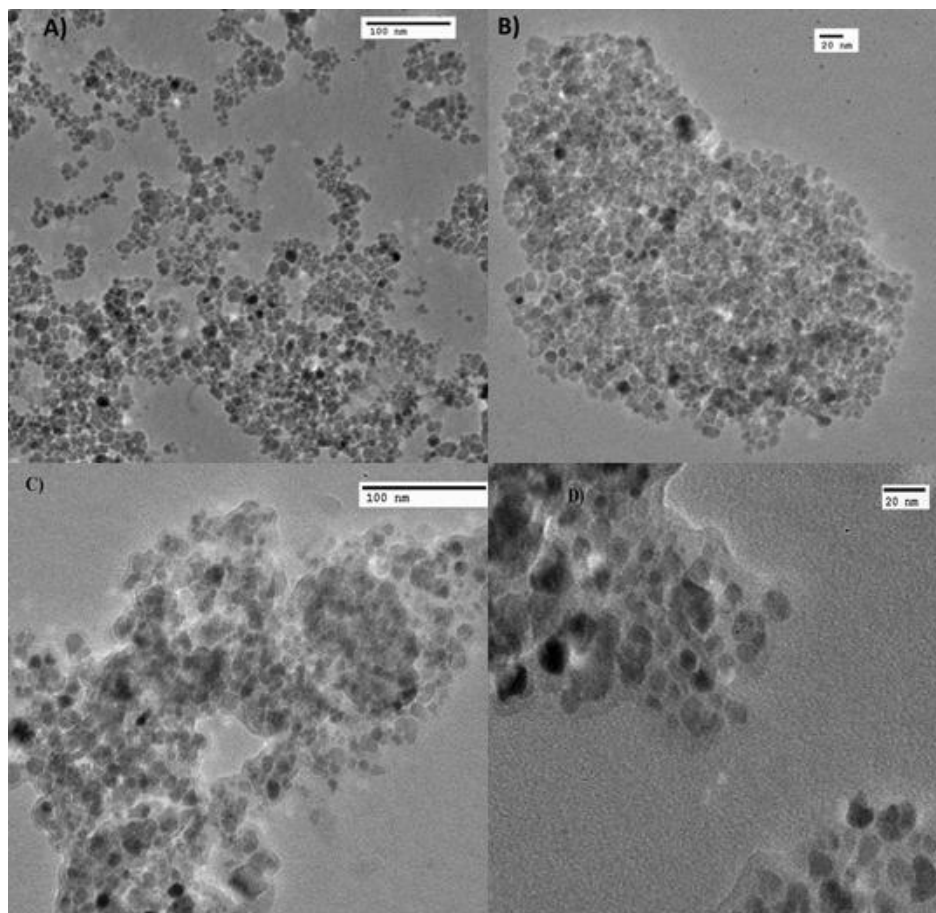


Figura 6 - A) Imagem TEM do Núcleo de Magnetite (Fe₃O₄) - ampliação 40000x; B) Imagem TEM Núcleo de Magnetite (Fe₃O₄) - ampliação 60000x; C) Imagem TEM do Núcleo de Magnetite (Fe₃O₄) revestido com sílica (SiO₂) - ampliação 50000x; D) Imagem TEM Núcleo de Magnetite (Fe₃O₄) revestido com sílica (SiO₂) - ampliação 100000x.

Outra técnica utilizada na caracterização do núcleo da magnetite foi a espectroscopia de infravermelho por transformadas de Fourier. Esta técnica permite identificar a composição química das partículas a partir dos picos característicos correspondentes à vibração das ligações químicas. Na Figura 7 estão presentes os espectros de infravermelho obtidos para a magnetite antes e depois da silanização e na Tabela 4 identificam-se as principais bandas de vibração observadas.

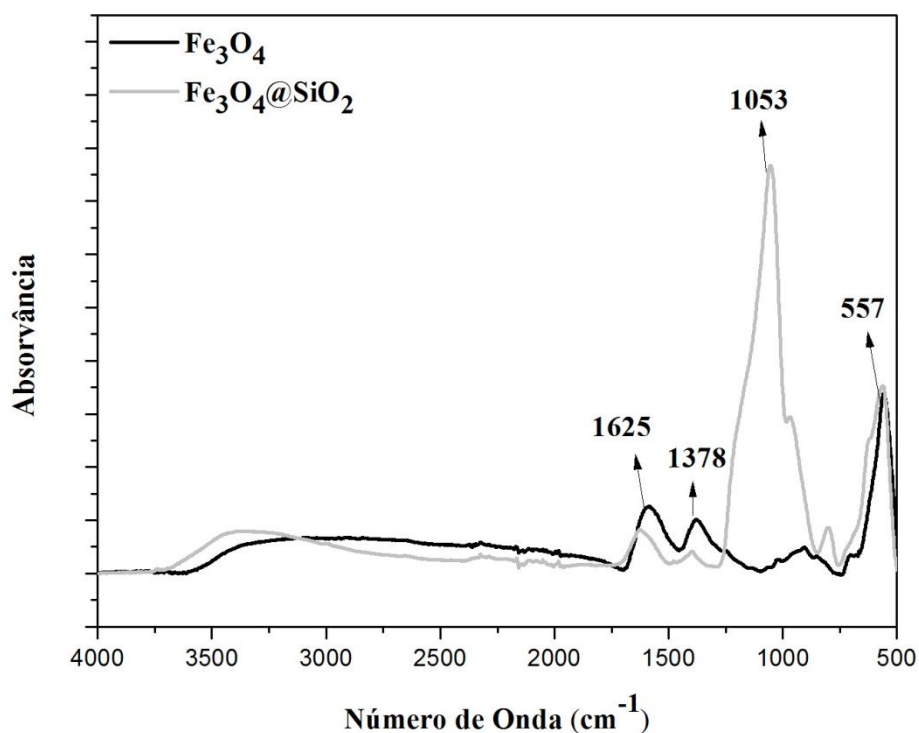


Figura 7 - Espectros de infravermelho (FTIR-ATR) do núcleo da magnetite antes e após silanização.

Nos espectros das nanopartículas de óxido de ferro observa-se uma banda de vibração a aproximadamente 557 cm^{-1} , característica da ligação Fe-O [205-207] (Tabela 4) validando a obtenção de um núcleo de Fe_3O_4 . Por sua vez, a existência de outros picos (p.e. a 1300 cm^{-1} (aproximadamente), e $1550\text{-}1610\text{ cm}^{-1}$ (aproximadamente)) indica a presença de citrato, que foi adicionado após a síntese da magnetite, de forma a ser obtida uma melhor dispersão das nanopartículas em meio aquoso, evitando assim a sua aglomeração [208].

Tabela 4 – Identificação das principais bandas de vibração dos espectros de FTIR das partículas Fe₃O₄ e Fe₃O₄@SiO₂

Núcleo de magnetite (etapa 1)			
Ligação química	Número de onda (cm ⁻¹)	Tipo de vibração	Referências
Fe-O	560		[205-207]
C=O	1585	Elongação	[209-211]
C-H	2870 2960 1380 1470 1050 907	Elongação Assimétrica Elongação Simétrica Deformação Simétrica Deformação Assimétrica Elongação no plano Elongação fora de plano	[210, 212-215]
O-H	1378 3300-2500	Deformação Elongação	[212, 216, 217]
C-O-H	1400 930	Deformação no plano Deformação fora do plano	[213, 218]
Núcleo de magnetite após silanização (etapa 2)			
Ligação química	Número de onda (cm ⁻¹)	Tipo de vibração	Referências
Fe-O	557		[205-207]
Si-OH	3700-3200	Elongação	[217]
Si-O-Si	1130-990	Elongação assimétrica	[217, 219]
Si-O-Fe	950	Elongação	[219]
O-H	1378 2500-3500	Deformação Elongação	[212, 216, 217]
C-H	2870 2960 1380 1470 1050 907	Elongação Assimétrica Elongação Simétrica Deformação Simétrica Deformação Assimétrica Elongação no plano Elongação fora de plano	[210, 212-215]

No caso do espectro das partículas após silanização (Figura 7 e Tabela 4) ainda se observam os picos referentes à ligação Fe-O. Adicionalmente observa-se o aparecimento de novos picos, sendo os mais proeminentes, os picos característicos da vibração Si-O-Fe e Si-O-Si com número de onda 950 cm⁻¹ [217] e 1050 cm⁻¹ [217, 219], respectivamente, o que confirma o crescimento de uma capa protetora de sílica (SiO₂) em torno das NPs.

A determinação do potencial zeta, que nos dá uma indicação da carga à superfície das partículas, consiste numa técnica que possibilita a medição da magnitude das interações eletrostáticas ou da carga de repulsão/atração entre as partículas. A sua determinação permite avaliar fatores como a dispersão, a agregação ou a floculação, podendo ser utilizado com o objetivo de otimizar formulações de dispersões, emulsões e suspensões [220]. Neste trabalho, em particular, o potencial zeta foi determinado com o intuito de validar as funcionalizações em estudo e avaliar a influência destas funcionalizações na estabilidade das NPs em solução. Os valores de potencial zeta obtidos para o núcleo magnético foram de $-10,8 \pm 0,1$ mV para um pH de 6,8. Estes valores negativos podem ser justificados pelo fato de existirem grupos -OH à superfície das NPs que procuram estabilizar os núcleos magnéticos em solução e que contribuem desta forma para a sua dispersão em solução [221]. Por sua vez, no caso do potencial zeta obtido para uma solução de NPs silanizadas, este apresenta valores de $-9,6 \pm 0,2$ mV a um pH de 6,8. Apesar de não existir uma diferença significativa entre os valores obtidos para as partículas antes e após o processo de silanização, no caso das partículas silanizadas os valores de zeta obtidos devem-se aos grupos Si-OH existentes na superfície das NPs [219].

Uma das características das nanopartículas que, atualmente tem fomentado a sua utilização é o facto de apresentarem pequenas dimensões, propriedade que lhes confere uma elevada área superficial específica. Esta característica possibilita a obtenção de valores elevados de superfície/volume e contribui para um aumento da eficiência de separação mais significativo comparativamente aos sistemas de dimensões micrométricas e colunas. A isotérmica de adsorção BET permite avaliar a área superficial por massa de partículas e foi aplicada com o objetivo de analisar a variação da área superficial com as funcionalizações e, consequentemente, avaliar se algum dos passos de funcionalização, favorece a aglomeração das partículas. O valor de área superficial obtido para a magnetite foi de $113,7 \text{ m}^2/\text{g}$, estando próximo dos valores apresentados noutros trabalhos [222, 223]. No caso das partículas silanizadas o valor de BET obtido foi de $110,1 \text{ m}^2/\text{g}$. A ligeira diminuição da área superficial das NPs após silanização pode dever-se ao aumento do tamanho de NP, após revestimento com SiO_2 .

Por fim, de forma a avaliar se as NPs obtidas apresentavam propriedades magnéticas e a influência do processo de silanização no magnetismo das NPs efetuaram-se medidas utilizando um SQUID.

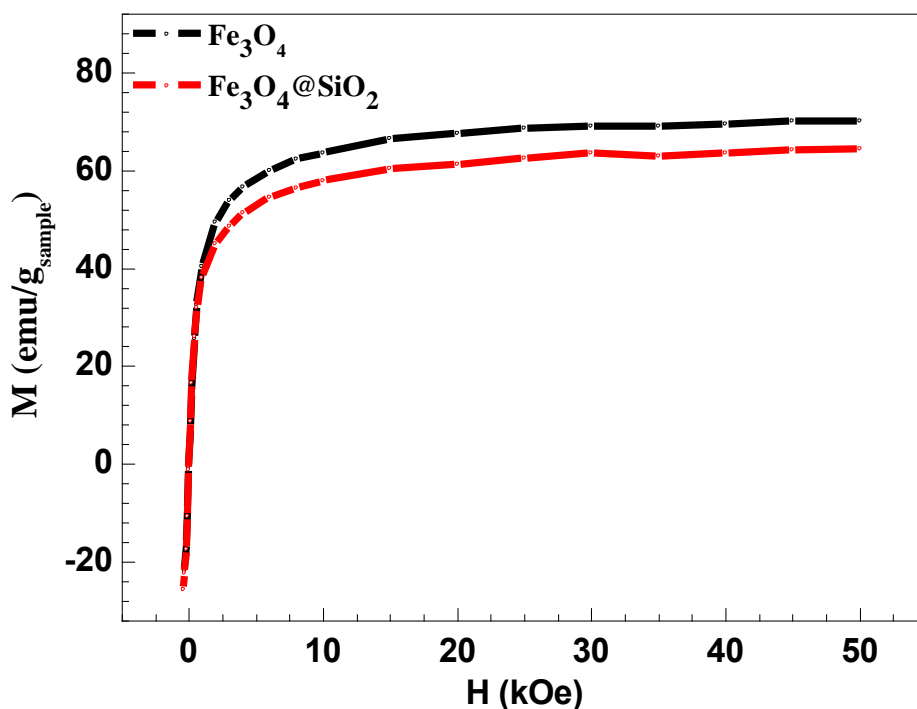


Figura 8 – Curva de magnetização das NPs antes e após silanização.

As curvas de magnetização obtidas para as NPs estão apresentadas na Figura 8 e demonstram o comportamento superparamagnético das NPs à temperatura ambiente. Os resultados indicam que a energia térmica é muito superior ao campo magnético intrínseco do material, levando assim a que os valores de magnetização residual espontânea à temperatura ambiente seja 0 ($\frac{\mu B}{T} \rightarrow 0$) e por esta razão à temperatura ambiente não há histerese. É também possível observar que com a aplicação do campo magnético o momento magnético das partículas alinha com a direção do campo magnético aplicado, atingindo-se a saturação magnética das NPs de Fe₃O₄ por volta de 65 emu/(g amostra), concordando com os valores descritos na literatura para magnetite de dimensões reduzidas (~ 10 nm) [224]. Após silanização, observa-se que há uma ligeira diminuição nos valores de magnetização das NPs e inclusive se observa uma diminuição no valor de saturação magnética para aproximadamente 60 emu/(g amostra), esta diminuição devendo-se ao crescimento da capa de sílica em torno do núcleo magnético.

3.1.2. Funcionalização da superfície das NPs com grupos amina e grupos carboxilo

A funcionalização das NPs (Figura 9) tem como objetivo a modificação dos grupos funcionais à superfície tornando desta forma possível a imobilização de inibidores constituídos por cadeias de aminoácidos (aprotinina). Para além de permitirem o acoplamento entre as NPs e os inibidores, espera-se também que estas funcionalizações contribuam para o aumento da capacidade de reação entre os inibidores e as NPs, possibilitando assim a imobilização de uma elevada quantidade de inibidores. O acoplamento NPs@Inibidores deverá ser feito pelo grupo -COOH existente na à superfície das NPs e o terminal amina dos inibidores, não sendo esperado que este acoplamento influencie a capacidade inibitória da aprotinina.

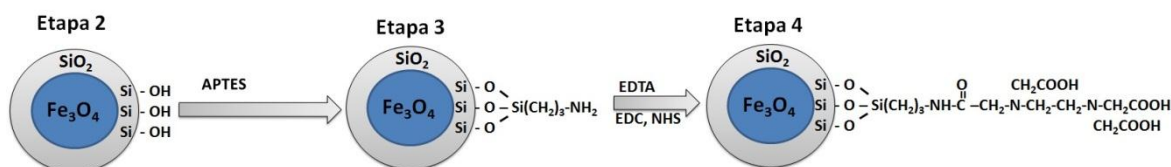


Figura 9 - Esquema da funcionalização da superfície das NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ com grupos -NH_2 e -COOH

Na Figura 10 encontra-se um esquema mais detalhado da reação da ativação do APTES em meio aquoso e funcionalização da superfície das NPs com grupos amina (etapa 3). Durante a reação de ativação da superfície, ocorrem duas reações em simultâneo: a hidrólise dos grupos alcoxi do n-silano passando a grupos silanol mais reativos, e a condensação destes grupos silanol com grupos -OH existentes à superfície das NPs originando ligações Si-O-Si estáveis [225].

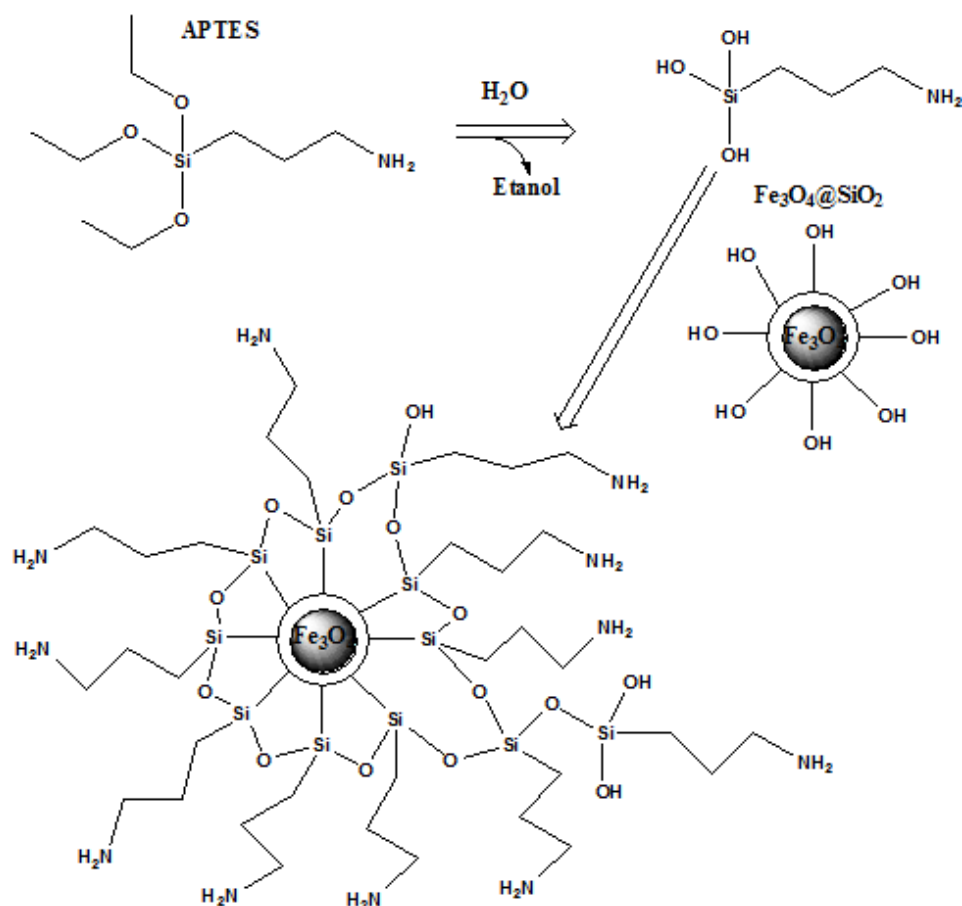


Figura 10 - Esquema da ativação do APTES em água e funcionalização das NPs com terminais amina.

No esquema da Figura 11 que representa a formação da ligação amida via ativação carbodiimida (etapa 4). Esta ligação acontece em dois passos: a ativação dos grupos –COOH na presença de EDC, após esta ativação formam-se esteres de NHS (ligação da molécula que contém os grupos –COOH ao NHS (ligação R-COO-N(NHS))) que são grupos reativos formados pela ativação dos grupos carboxilato por parte do EDC que reagem com as aminas primárias levando à formação de ligações amida estáveis. Ambos os ligandos (EDC e NHS) não ficam integrados na estrutura final. Este procedimento foi utilizado para a vectorização das NPs com grupos –COOH (etapa 4) e para imobilização com a aprotinina (etapa 5).

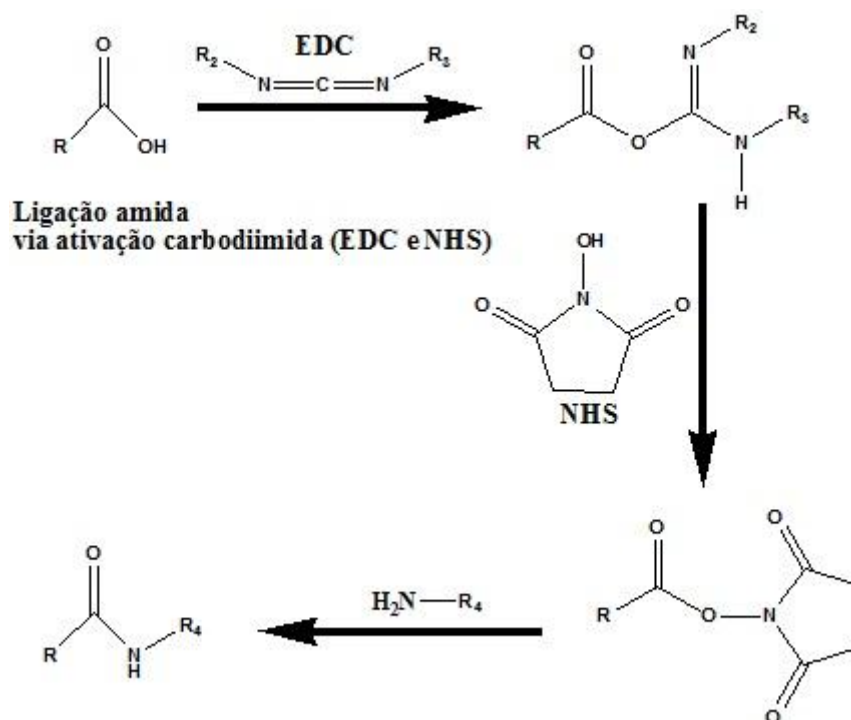


Figura 11 - Esquema da ligação amida via ativação carbodiimida com EDC e NHS.

Tal como aconteceu no caso da silanização, a espectroscopia de infravermelho foi utilizada com o objetivo de comparar os espectros das partículas antes e após a funcionalização e avaliar desta forma o aparecimento de novos picos característicos nos espectros das NPs após funcionalização. As principais bandas de vibração estão identificadas na Tabela 5.

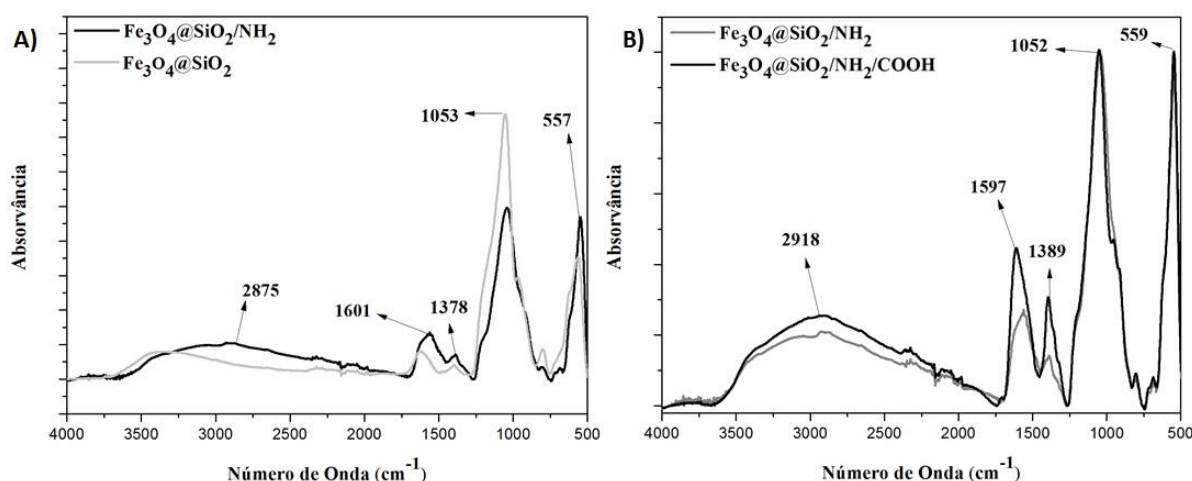


Figura 12 - A) Espectros de FTIR da magnetite após silanização e após funcionalização com APTES; B) Espectros de FTIR das NPs funcionalizadas com APTES e NPs após funcionalização com EDTA.

Através da análise da Figura 12 A e da Tabela 5 é possível observar que a funcionalização da superfície das NPs com terminais -NH_2 é exequível. A funcionalização foi confirmada pelo aparecimento de bandas características do APTES no espectro de FTIR das NPs funcionalizadas, destacando-se a presença de bandas características da ligação Si-CH_2 , da ligação N-H/NH_2 e da ligação N-CH_2 , a 1270 cm^{-1} [219], a $3335\text{ cm}^{-1}/1615\text{ cm}^{-1}$ [219, 226] e a 2870 cm^{-1} [227], respetivamente. O aparecimento destas bandas referentes a estes números de onda indica a existência de APTES agraado à superfície das partículas, conferindo-lhes assim terminais -NH_2 à superfície.

No caso das partículas funcionalizadas com grupos terminais -COOH , através da ligação amida entre as NPs com terminais -NH_2 e moléculas de EDTA, foi possível observar o aparecimento de picos característicos do EDTA.

Tabela 5 - Dados referentes ao espectro de FTIR da magnetite após funcionalização com APTES e EDTA

Magnetite após funcionalização com APTES (etapa 3b)			
Ligação química	Número de onda (cm ⁻¹)	Tipo de vibração	Referências
Fe-O	560		[205-207]
Si-OH	3700-3200	Elongação	[217]
Si-O-Si	1130-990	Elongação assimétrica	[217, 219]
Si-O-Fe	950	Elongação	[219]
O-H	1378 2500-3500	Deformação Elongação	[212, 216, 217]
Si-CH ₃	1270	Deformação simétrica	[219]
C-H	2870 2960 1380 1470 1050 907	Elongação Assimétrica Elongação Simétrica Deformação Simétrica Deformação Assimétrica Elongação no plano Elongação fora de plano	[210, 212-215]
C-N	1653 1567 1299	Elongação Elongação Elongação	[228, 229]
N-H	3335 1615	Elongação Deformação (N-H)	[219, 226]
N-CH ₂	2780	Elongação	[227]
Magnetite após vectorização com EDTA (etapa 4)			
Ligação química	Número de onda (cm ⁻¹)	Tipo de vibração	Referências
Fe-O	560		[205-207]
Si-OH	3700-3200	Elongação	[217]
Si-O-Si	1130-990	Elongação assimétrica	[217, 219]
Si-O-Fe	950	Elongação	[219]
O-H	1378 2500-3500	Deformação Elongação	[212, 216, 217]
Si-CH ₂	1270	Deformação simétrica	[219]
C-H	2870 2960 1380 1470 1050 907	Elongação Assimétrica Elongação Simétrica Deformação Simétrica Deformação Assimétrica Elongação no plano Elongação fora de plano	[210, 212-215]
C-N	1653 1567 1299	Elongação Elongação Elongação	[228, 229]
N-H	3335 1615	Elongação Deformação (N-H)	[219, 226]
N-CH ₂	2780	Elongação	[227]
C-O-H	1400 930	Deformação no plano Deformação fora do plano	[213, 218]
C-O	1300	Elongação	[213]
C=O	1585	Elongação	[209-211]

De acordo com as Tabela 4/Tabela 5 e a Figura 12 B, foi notório um aumento da intensidade das bandas localizadas a 1598 cm^{-1} e 1389 cm^{-1} e um acréscimo da intensidade na região do espectro entre 3300 cm^{-1} - 2500 cm^{-1} , sendo estes picos indicadores da presença das ligações C=O [209-211], C-O-H [213, 218], O-H [212, 216, 217], e C-H [210, 212-215] presentes na molécula de EDTA. O aumento nesta região do espectro, também pode resultar da contribuição da vibração da ligação C-N da amida a 1653 cm^{-1} , a 1567 cm^{-1} e a 1299 cm^{-1} [228, 229]. Estes resultados permitiram validar o sucesso da vectorização com EDTA, através da ligação amida à superfície das NPs, conferindo-lhes grupos – COOH à superfície.

O potencial zeta das NPs foi medido com o objetivo de confirmar os processos em estudo, neste caso a funcionalização com terminais -NH_2 e a vectorização com EDTA, sendo esperado que estas funcionalizações tenham influência nos valores de potencial zeta obtidos. No caso das partículas funcionalizadas com APTES, obteve-se um valor de potencial zeta de $-2,8 \pm 1,5\text{ mV}$. Comparando este valor com o valor de potencial zeta obtido para as NPs após a silanização ($-6,5 \pm 0,5\text{ mV}$; pH 6,8), verificou-se um aumento do valor de potencial zeta, tal como era esperado. Este incremento é justificado pela existência de grupos -NH_2 na superfície das partículas que ao pH utilizado (6,8) encontram-se na forma de NH_3^+ , conferindo carga superficial às NPs [221, 230]. Apesar de ser esperado um valor positivo para as partículas funcionalizadas com APTES, a existência de grupos -OH à superfície das partículas juntamente com os grupos -NH_3^+ , conferiram às NPs valores de potencial zeta próximos de zero. No caso das NPs após vectorização com EDTA, verificou-se um decréscimo no valor de potencial zeta para, aproximadamente, $-6,5 \pm 0,1\text{ mV}$. Nesta situação a diminuição dos valores zeta deveu-se à presença de -COO^- à superfície das NPs, o que lhes conferiu carga negativa [231]. Em ambos os casos a alteração dos valores de potencial zeta a um pH de, aproximadamente, 6,8 sugere que a funcionalização em estudo foi efetuada com sucesso.

À semelhança do efetuado antes, mediu-se a área superficial específica das NPs. Os valores de área BET obtidos foram, $72,3\text{ m}^2/\text{g}$ para as NPs funcionalizadas com APTES (etapa 3) e $56,2\text{ m}^2/\text{g}$ no caso das partículas funcionalizadas com EDTA (etapa 4). A modificação superficial das NPs com um aminossilano diminui a área superficial específica, demonstrando que ocorreu a funcionalização [232] e justificando assim a diminuição da área superficial das NPs. Outro fator que poderá estar na origem deste

decréscimo na área superficial das partículas, em ambos os casos, pode ser a ocorrência de fenómenos de floculação durante as funcionalizações ou durante o pré-tratamento da amostra antes de realizar a análise de BET.

Após análise dos resultados obtidos na caracterização das NPs após funcionalização com APTES, é possível concluir que foi possível funcionalizar a superfície das NPs com grupos -NH_2 . Posteriormente, procedeu-se à funcionalização com EDTA conferindo assim à superfície das NPs grupos -COOH . Esta funcionalização foi realizada através da formação da ligação amida utilizando o EDC e NHS como agentes de acoplamento entre a amina primária e os grupos -COOH presentes na molécula de EDTA. A formação da ligação amida por ativação por carbodiimida, apresenta diversas vantagens pois, pode ocorrer em meio aquoso, apresenta baixos custos associados e os rendimentos obtidos são relativamente elevados [233]. Por esta razão, neste trabalho foi testada a funcionalização da superfície das NPs com grupos -COOH , por ligação amida por ativação carbodiimida em meio aquoso utilizando a molécula de EDTA. A utilização estratégica da molécula de EDTA deve-se ao facto desta molécula possuir 4 grupos -COOH na sua estrutura. Por esta razão, após a funcionalização da superfície das NPs, será esperado que a superfície nas NPs seja funcionalizada com 3 grupos -COOH por cada grupo -NH_2 reagido. Esta abordagem mostra-se bastante promissora no acoplamento de biomoléculas à superfície de NPs magnéticas, uma vez que os grupos -COOH são altamente reativos com biomoléculas (p.e. proteínas) [221] e também, devido ao elevado número de grupos -COOH à superfície das NPs.

3.1.3. Acoplamento dos inibidores na superfície das nanopartículas

A última etapa no processo de desenvolvimento de NPs magnéticas funcionais reside na imobilização de inibidores. Foram acoplados dois tipos de inibidores, a Aprotinina (que foi ligada às NPs magnéticas contendo grupos COOH à superfície - Figura 13) e o EDTA-TMS (que foi ligado diretamente às NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ Figura 14).

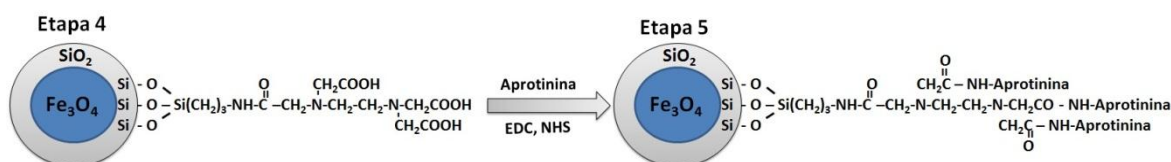


Figura 13 - Esquema do acoplamento da aprotinina na superfície das NPs

O acoplamento da aprotinina à superfície das NPs realiza-se com recurso a um protocolo não agressivo que permite emparelhar os grupos carboxilos (-COOH) existentes na superfície das NPs com os terminais amina presentes na aprotinina. Após acoplamento estas NPs não foram analisadas por DRX nem TEM, uma vez que não seriam esperadas alterações na estrutura cristalina das NPs nem na sua morfologia.

Os valores de área superficial BET, para as NPs acopladas com aprotinina foram de, aproximadamente, 107,5m²/g. Este resultado permite então concluir que nenhum dos passos intermédios influenciou a estabilidade ou conduziu à floculação das NPs, permitindo assim manter uma elevada área superficial. No caso espectroscopia de infravermelho, não foram identificadas diferenças entre o espectro das NPs Fe₃O₄@SiO₂/NH₂/COOH e as NPs acopladas à aprotinina (anexo).

De forma a avaliar a quantidade de aprotinina imobilizada à superfície das NPs quantificou-se a proteína existente na solução antes e após incubação com as nanopartículas e estimando-se a quantidade de aprotinina imobilizada pela diferença entre a quantidade de proteína na solução inicial e a quantidade de proteína no sobrenadante de incubação. A concentração de aprotinina na solução inicial foi de 0,5378 mg/ml e no caso do sobrenadante da incubação das NPs com aprotinina não foi possível quantificar a quantidade de proteína em solução o que parece sugerir a adsorção total.

Na etapa 6, as partículas após silanização foram submetidas a uma reação com EDTA-TMS sendo esperado que, após esta funcionalização, as NPs apresentem especificidade para proteínas/enzimas nas quais o EDTA tenha capacidade quelante e iniba a sua ação (Figura 14). A caracterização das partículas resultantes desta etapa constitui um passo importante, uma vez que as condições utilizadas nesta funcionalização são consideradas agressivas para os núcleos de magnetite (EDTA-TMS, etanol, 90°C, em meio ácido). Uma silanização deficiente pode conduzir a alterações nas propriedades da amostra tais como a morfologia, aglomeração, entre outros fatores que podem no limite, levar à degradação da amostra.

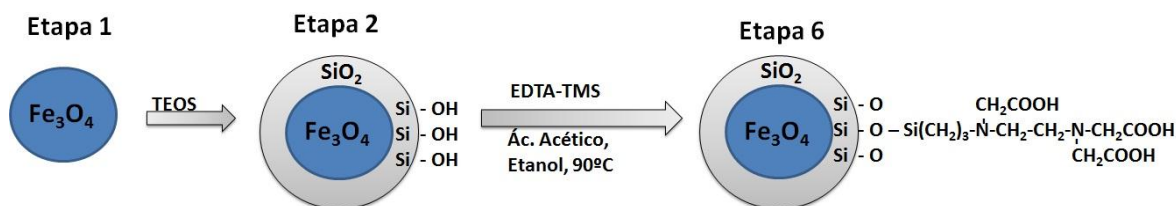


Figura 14- Esquema da funcionalização da superfície das NPs Fe₃O₄@SiO₂ com EDTA-TMS

A ligação do EDTA-TMS não alterou a estrutura cristalina, não se verificando alterações entre os difratogramas obtidos para o núcleo magnetite e para as partículas funcionalizadas (anexo), tal como seria previsto. Contudo, as temperaturas elevadas e o meio ácido poderão ter induzido alguma oxidação da magnetite a maguemite, visto que foi observável o aparecimento da cor castanha nas NPs (anexo) [234]. Outro aspeto detetado após a ligação do EDTA-TMS, foi a alteração da coloração da solução sobrenadante, que inicialmente era transparente e após processo de funcionalização passou a ser ligeiramente castanha. Esta alteração na cor é um indicador da existência de iões Fe^{3+} em solução que podem ter sido libertados para o meio (anexo). Outro fator que indicia esta perda de iões, é a perda de massa de nanopartículas durante o processo. Uma desvantagem que poderá decorrer da libertação de iões de Fe^{3+} é a possibilidade destes formarem complexos com o EDTA-TMS, o que poderá afetar a capacidade de interação das NPs com as metaloproteínas.

Tal como foi referido, o processo de funcionalização das NPs com EDTA-TMS é feito sob condições que podem ser agressivas ao núcleo magnético, pois estes foram sujeitos a um ambiente ácido, a temperaturas elevadas e na presença de um agente quelante (EDTA-TMS). Assim, é importante avaliar a morfologia das NPs e verificar se a capa protetora permanece intacta.

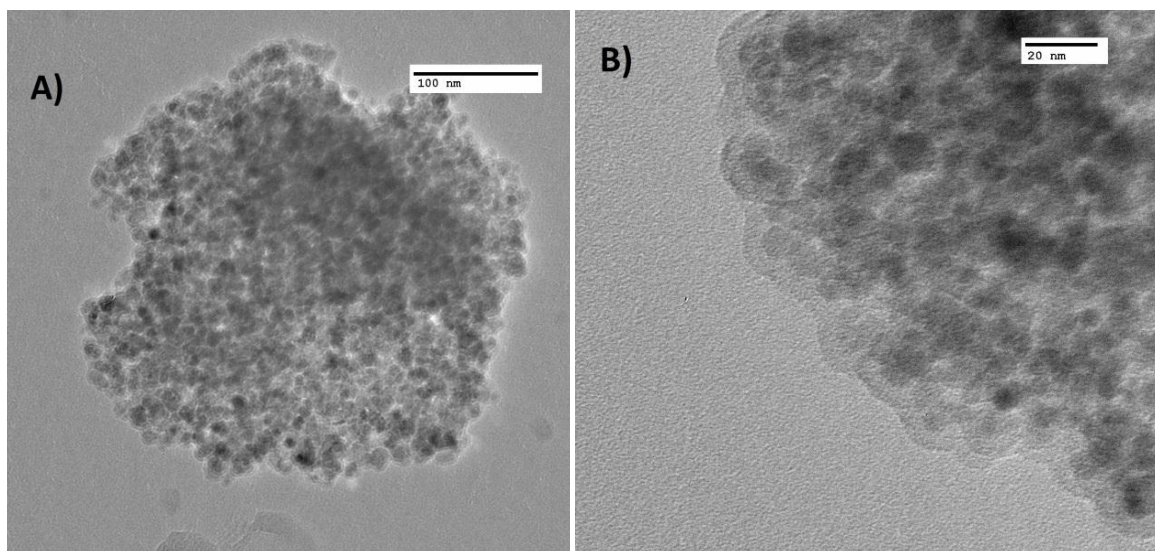


Figura 15 - A) Imagem TEM do Núcleo de Magnetite (Fe_3O_4) revestido com sílica (SiO_2) e superfície funcionalizada com EDTA-TMS- ampliação 50000x; B) Imagem TEM Núcleo de Magnetite (Fe_3O_4) revestido com sílica (SiO_2) e superfície funcionalizada com EDTA-TMS - ampliação 150000x

As imagens de TEM (Figura 15) obtidas para as partículas modificadas com EDTA-TMS (etapa 6) permitiram constatar que as NPs mantiveram a sua morfologia esférica e que o tamanho médio final era de $10,3 \pm 3,16$ nm. Foi igualmente possível observar alguma aglomeração das NPs que pode resultar da funcionalização da funcionalização ou do procedimento de preparação da amostra para microscopia.

Como foi referenciado anteriormente, durante o processo de funcionalização das NPs com a molécula de EDTA-TMS, com o objetivo de as funcionalizar com terminais –COOH, estas foram sujeitas a condições de temperatura e pH que poderiam afetar a sua estabilidade, morfologia e até mesmo levar à sua degradação. A medição da área superficial das partículas é importante, uma vez que permite fazer uma avaliação sobre a superfície de contacto disponível das partículas. O valor de BET obtido para as partículas funcionalizadas com EDTA-TMS (etapa 6) foi $216,9 \text{ m}^2/\text{g}$. Este valor é bastante superior ao obtido para as NPs na etapa que antecede que foi de $110,1 \text{ m}^2/\text{g}$, o que pode indicar que estas condições podem induzir alguma porosidade na capa de sílica aumentando assim os valores de área superficial obtidos.

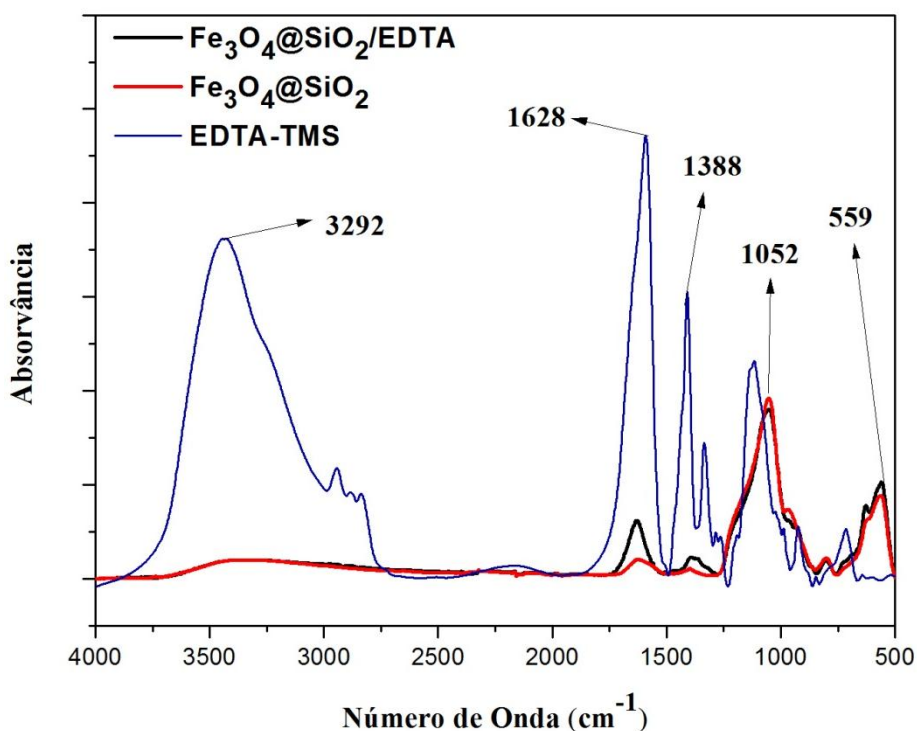


Figura 16 - Espetros de FTIR das NPs após silanização, após funcionalização com EDTA-TMS e espectro de FTIR da molécula de EDTA-TMS

Através da análise e comparação dos espectros de FTIR obtidos para as NPs após a silanização (Figura 16 e Tabela 6) com os espectros obtidos para as NPs após reação com EDTA-TMS e o espectro da amostra de EDTA-TMS foi possível observar que as NPs após funcionalização com EDTA-TMS apresentaram alguns picos coincidentes com os picos obtidos pelo espectro de EDTA-TMS.

Tabela 6 - Identificação das principais bandas de vibração dos espectros de FTIR da molécula de EDTA-TMS FTIR e das NPs após funcionalização com EDTA-TMS

EDTA-TMS			
Ligação química	Número de onda (cm ⁻¹)	Tipo de vibração	Referências
O-H	1378 2500-3500	Deformação Elongação	[212, 216, 217]
C=O	1585	Elongação	[209-211]
C-H	2870 2960 1380 1470 1050 907	Elongação Assimétrica Elongação Simétrica Deformação Simétrica Deformação Assimétrica Elongação no plano Elongação fora de plano	[210, 212-215]
Si-OH	3700-3200	Elongação	[217]
Si-O-Si	1130-990	Elongação assimétrica	[217]
N-CH ₂	2780	Elongação	[219, 226]
Magnetite Funcionalizada com EDTA-TMS (etapa 6)			
Ligação química	Número de onda (cm ⁻¹)	Tipo de vibração	Referências
Fe-O	557		[205-207]
Si-O-Si	1130-990	Elongação assimétrica	[217]
C-O	1300	Elongação	[213]
O-H	1378 3300-2500	Deformação Elongação	[212, 216, 217]
C-O-H	1400 930	Deformação no plano Deformação fora do plano	[213, 218]
C=O	1585	Elongação	[209-211]
C-N	1653 1567 1299	Elongação Elongação Elongação	[228, 229]
N-CH ₂	2780	Elongação	[219, 226]
C-H	2870 2960 1380 1470 1050 907	Elongação Assimétrica Elongação Simétrica Deformação Simétrica Deformação Assimétrica Elongação no plano Elongação fora de plano	[210, 212-215]
Si-OH	3700-3200	Elongação	[217]
Si-O-Fe	950	Elongação	[219]

A comparação dos espectros das NPs silanizadas e das NPs funcionalizadas com EDTA-TMS, verificou-se que, após a funcionalização, os picos característicos das vibrações foram C=O (1585 cm^{-1}) [209-211], C-N (1653 cm^{-1} ; 1567 cm^{-1} ; 1299 cm^{-1}) [228, 229], C-O (1300 cm^{-1}), C-O-H (1400 cm^{-1} ; 930 cm^{-1}) e C-H (2870 cm^{-1} ; 2960 cm^{-1} ; 1380 cm^{-1} ; 1470 cm^{-1} ; 1050 cm^{-1} ; 907 cm^{-1}) [210, 212-215], sendo que foi ainda possível observar um aumento na zona correspondente às vibrações da ligação O-H ($3300\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$) [212, 216, 217]. Estes resultados permitiram validar a eficiência da funcionalização das NPs com EDTA-TMS, sendo esperado que a partir deste passo as partículas exibam capacidade quelante e por esta razão sejam capazes de interagir com o núcleo metálico de algumas enzimas/proteínas permitindo, assim, a sua separação do meio [235-237].

O valor de potencial zeta das partículas funcionalizadas por EDTA-TMS é de $-23,9\pm 0,8\text{ mV}$. Comparando este valor com o valor obtido das NPs da etapa 2 (passo anterior), foi possível verificar uma diminuição dos valores de potencial, indicando, o sucesso da funcionalização com grupos -COOH . Uma vez que parte destes grupos a pH de 6,8 se encontram na forma de -COO^- , houve uma contribuição na diminuição da carga superficial das partículas [231].

Após caracterização das NPs, constata-se que foi possível acoplar os inibidores às NPs sem levar a alteração da estrutura do núcleo magnético ou das suas propriedades. Desta forma, o passo seguinte consistiu na avaliação da capacidade das NPs funcionalizadas e acopladas aos inibidores de interagirem especificamente com as enzimas em estudo, e se será possível a aplicação destas em sistemas de enriquecimento de proteases.

3.2. Enriquecimento de enzimas

Neste trabalho após imobilização dos inibidores na superfície das NPs, foi testada a sua capacidade de interagir especificamente com proteínas/enzimas e avaliou-se a sua potencialidade no desenvolvimento de um sistema de enriquecimento de proteases. A especificidade e a capacidade de enriquecimento foram avaliadas por SDS-PAGE e Zimografia.

3.2.1. Enriquecimento de Metaloproteínas– NPs@EDTA (Etapa 6)

3.2.1.1. Avaliação das condições ótimas

As ligações entre a enzima-alvo e os inibidores imobilizados nas NPs ocorrem com base em interações que dependem das propriedades estruturais da enzima e do inibidor, estas propriedades são influenciadas por fatores externos. De modo a otimizar o processo de enriquecimento de proteases e a avaliar a especificidade do sistema, este foi testado em diversas condições. A eficiência das NPs foi avaliada fazendo variar os seguintes fatores:

- tempo de incubação (30 minutos; 1 hora; 2 horas e 4 horas)
- massa de NPs (1; 3 e 5 mg)
- massa de mioglobina e BSA em solução (6; 40 e 160 µg)
- e diferentes proporções de proteínas (entre mioglobina e BSA 3:1; 5:1 e 10:1).

Na Tabela 7 encontram-se detalhadas as condições de incubação das NPs@EDTA (etapa 6) em solução à temperatura ambiente sob agitação mecânica. Após incubação as NPs foram separadas da solução através da aplicação de um campo magnético e o sobrenadante foi descartado.

Tabela 7 - Condições de incubação das NPs@EDTA em soluções de proteína e densidades óticas obtidas na respetiva banda nos géis SDS-PAGE.

Amostra	Massa NPs	Tempo	pH	Massa Mioglobina	Massa BSA	Massa Estimada (Densidade Ótica)	
						Mioglobina	BSA
E30m	1 mg	30 minutos	7,4	50µg	50µg	0,6 µg	0,3 µg
E1h	1 mg	1 hora	7,4	50µg	50µg	0,5 µg	0,3 µg
E2h	1 mg	2 horas	7,4	50µg	50µg	1,2 µg	1,1 µg
E4h	1 mg	4 horas	7,4	50µg	50µg	2,0 µg	1,0 µg
E3x	1 mg	4 horas	7,4	50µg	150µg	0,8 µg	0,2 µg
E5x	1 mg	4 horas	7,4	50µg	250µg	0,7 µg	0,5 µg
E10x	1 mg	4 horas	7,4	50µg	500µg	1,2 µg	1,0 µg
E6µg	1 mg	4 horas	7,4	6µg	6µg	0 µg (aprox)	0 µg (aprox)
E40µg	1 mg	4 horas	7,4	40µg	40µg	1,3 µg	0,5 µg
E160µg	1 mg	4 horas	7,4	160µg	160µg	1,2 µg	0,5 µg
E1mg	1 mg	4 horas	7,4	50µg	50µg	1,2 µg	0,7 µg
E3mg	3 mg	4 horas	7,4	50µg	50µg	1,7 µg	1,7 µg
E5mg	5 mg	4 horas	7,4	50µg	50µg	2,7 µg	1,8 µg
Padrão BSA	-	-	7,4	-	7,5µg	-	7,5 µg
Padrão Mioglobina	-	-	7,4	7,5µg	-	7,5 µg	-

Através da análise do gel SDS-PAGE da Figura 17 e da Tabela 7 observa-se que nas colunas BSA e Mio foram obtidas bandas intensas aos pesos de 66 kDa e aproximadamente 17 kDa, a densidade ótica destas bandas foi também determinada utilizando o *software Image Lab*. Estas bandas correspondem aos pesos moleculares da BSA (66 kDa) e da mioglobina (17 kDa) [238]. Após incubação destas proteínas com as NPs@EDTA observa-se através da comparação entre as densidades óticas obtidas para cada proteína, que as NPs@EDTA apresentam uma maior afinidade à mioglobina. Esta afinidade deve-se à presença do grupo Heme na constituição desta proteína que possui um catião metálico Fe^{2+} , o qual interage com os grupos $-\text{COOH}$ com ação quelante à superfície das NPs [240], permitindo assim a sua separação do meio. Apesar de não ser esperado que estruturalmente a BSA interagisse com as NPs, observa-se que uma parte residual da BSA permanece ligada às NPs. Isto pode ser explicado pelo facto de uma das funções da BSA ser ligar zinco (Zn^{2+}) e ser através desta ligação a interação da BSA às NPs@EDTA [240].

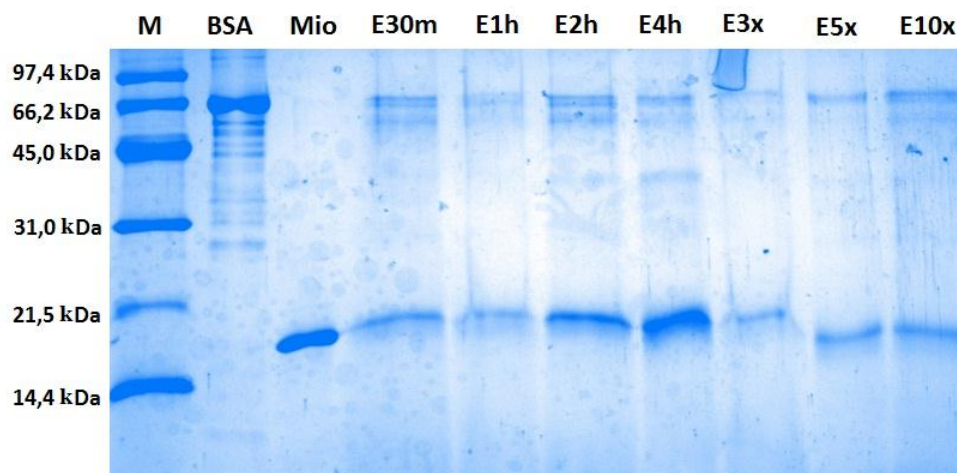


Figura 17 - Gel SDS-PAGE – Incubação NPs@EDTA em soluções de proteína. Teste de condições de tempo e proporções entre massa de mioglobina e BSA. M – Marcador de peso molecular; BSA – Padrão de BSA; Mio – padrão de mioglobina; E30m, E1h, E2h, E4h – Incubação de NPs durante 30 min, 1, 2 3 4 horas respectivamente. E3x, E5x, E10x – Ensaio em que a massa de BSA em solução é 3,5 e 10 vezes superior à massa de mioglobina

Quando se analisam os resultados referentes ao efeito do tempo de incubação (E30m, E1h, E2h e E4h), constata-se que com o aumento do tempo de incubação maior é a quantidade de mioglobina ligada às NPs@EDTA. No caso dos ensaios em que a massa de BSA em solução era 3, 5 e 10 vezes superior à de mioglobina, observou-se que apesar de haver um aumento na proporção de BSA relativamente à mioglobina, o sistema continuou a demonstrar maior especificidade à mioglobina.

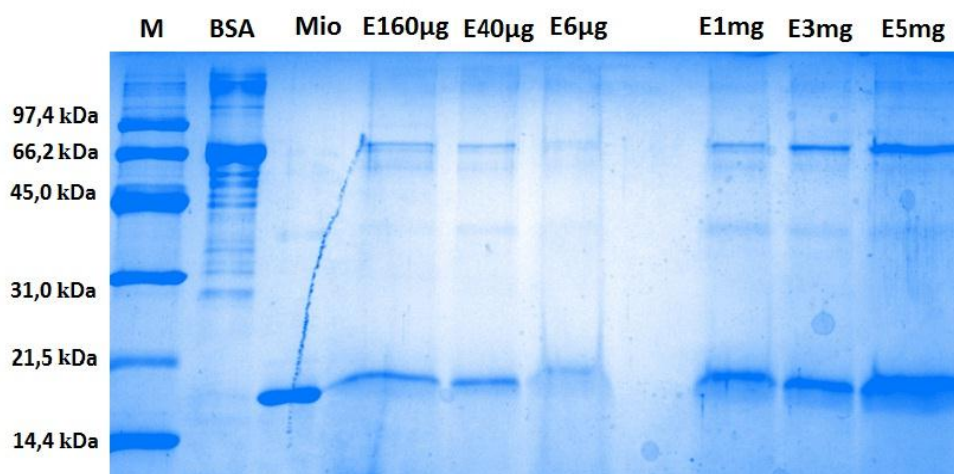


Figura 18- Gel SDS-PAGE - Incubação NPs@EDTA em soluções de proteína. Teste de condições de massa de proteínas e massa de NPs; M – Marcador de peso molecular; BSA – Padrão de BSA; Mio – padrão de mioglobina; E6µg, E40µg, E160 µg – Ensaio em que foram adicionadas 6, 40 e 160 µg de Mioglobina + 6, 40 e 160 µg BSA, respectivamente; E1mg, E3mg e E5g - Ensaio em que foi incubada 1, 3 e 5 mg de NPs na solução, respectivamente.

Cruzando as informações obtidas no gel SDS-PAGE da Figura 18 com as informações da Tabela 7, é de notar que nos resultados obtidos nas colunas E1mg, E3mg e E5mg, apesar de haver um aumento da quantidade de Mioglobina proporcional à quantidade de NPs utilizadas, observa-se também que com o aumento da quantidade de NPs há também um aumento da quantidade de BSA. Este resultado pode indicar que um excesso de NPs em solução pode diminuir a especificidade do sistema de purificação. No caso das colunas E160µg, E40µg e E6µg, constata-se que com o aumento da quantidade de proteína em solução há um aumento da quantidade de proteína ligada às NPs até se atingir a saturação da capacidade de ligar proteínas das NPs, pois é possível observar que foram obtidos resultados idênticos de densidade ótica para as amostras E160µg e E40µg.

3.2.2. Especificidade em biofluidos

Quando se pensa na criação de um sistema de caracterização e enriquecimento de proteínas, para além da determinação das condições ótimas, um dos fatores fundamentais a avaliar é a sensibilidade desse sistema de purificação a agentes caotrópicos. De forma, a avaliar a sensibilidade deste sistema, 5 mg NPs@EDTA foram incubadas em 500µL de urina, durante 4 horas, à temperatura ambiente e à qual foram adicionados 20 e 50 µg de Mioglobina e BSA.

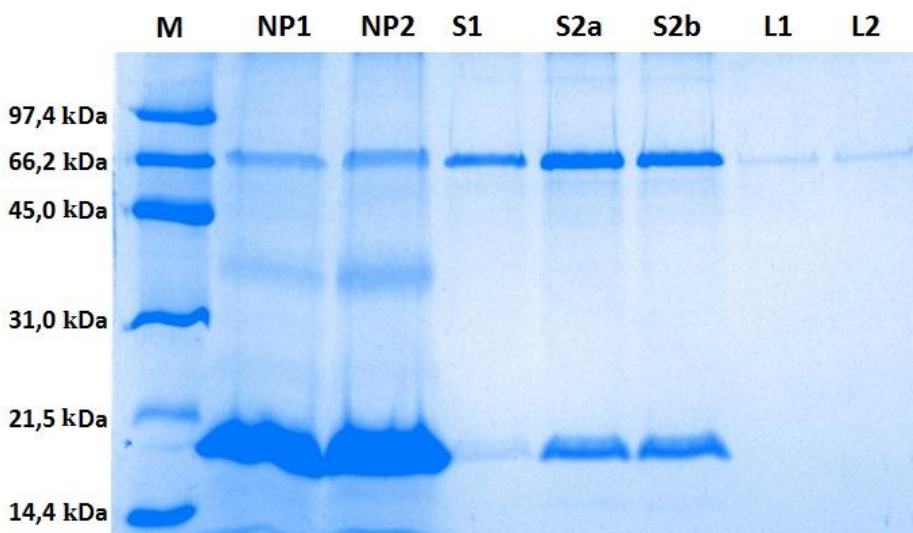


Figura 19 - Gel SDS-PAGE - Incubação de NPs em urina com adição de BSA e Mioglobina; M- Marcador de peso molecular; NP1- NPs em Urina em que foram adicionadas 20 µg de Mioglobina + 20 µg de BSA; NP2- NPs em Urina em que foram adicionadas 50 µg de Mioglobina + 50 µg de BSA; S1 – Sobrenadante de incubação das NP1; S2a, S2b- Sobrenadante de incubação das NP2 (em duplicado); L1, L2 – Solução da primeira lavagem das NP1 e NP2, respetivamente.

Como se pode observar na Figura 19, na presença de agentes caotrópicos como a ureia existente na urina, as NPs@EDTA continuaram a exibir capacidade de interagir especificamente com os iões metálicos presentes na mioglobina, permitindo assim a sua separação da solução (NP1 e NP2). Quando se observam os resultados do SDS-PAGE relativos às proteínas existentes no sobrenadante de incubação, é possível observar que no caso da S1, quase não se observa a presença de mioglobina enquanto a banda referente à BSA se apresenta com uma intensidade 4 vezes superior, demonstrando que as NPs@EDTA apresentaram especificidade e capacidade de purificação, mesmo na presença de alguns interferentes. O mesmo se pode observar pelos resultados obtidos em S2a e S2b. Nestes casos, é também possível observar que se atingiu a saturação das NPs. Por fim, é de notar que tanto em L1 como em L2, apenas é possível identificar a banda da BSA. Este resultado indica que durante o processo de lavagem apenas há libertação de proteínas/enzimas que estejam ligadas à matriz não-especificamente, demonstrando mais uma vez a especificidade do sistema de purificação de NPs@EDTA.

A saliva é um biofluido constituído por uma grande variedade de enzimas que existem numa ampla gama de concentrações. O facto do proteoma salivar ser rico, faz com que a sua utilização em métodos de diagnóstico seja estudada. Neste ensaio testaram-se as NPs@EDTA para avaliar a capacidade destas NPs interagirem com MMPs presentes na saliva, permitindo assim o seu enriquecimento.

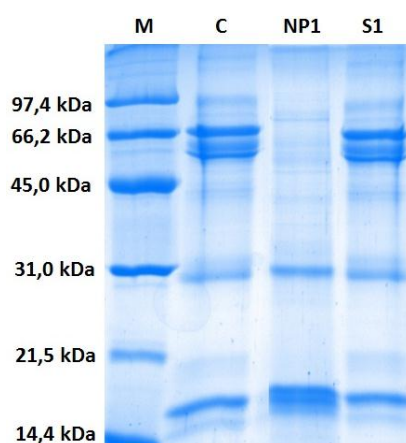


Figura 20 - Gel SDS-PAGE - Incubação de NPs (etapa 1) em Saliva; M – Marcador de peso molecular; C – Amostra de saliva controlo; NP1 - Proteínas-que ligaram às NPs. S1 - Sobrenadantes da incubação das NPs na saliva

Na Figura 20 encontra-se um gel SDS-PAGE que demonstra o perfil proteico das proteínas que interagem com a magnetite (etapa 1) após incubação com saliva. Comparando a Figura 20 com a Figura 21 é possível constatar que os perfis proteicos obtidos em ambas as amostras são bastante distintos, indicando que a funcionalização com EDTA-TMS conferiu às NPs afinidade para proteínas de maior peso molecular, validando assim o sucesso da funcionalização e indiciando alguma especificidade do sistema.

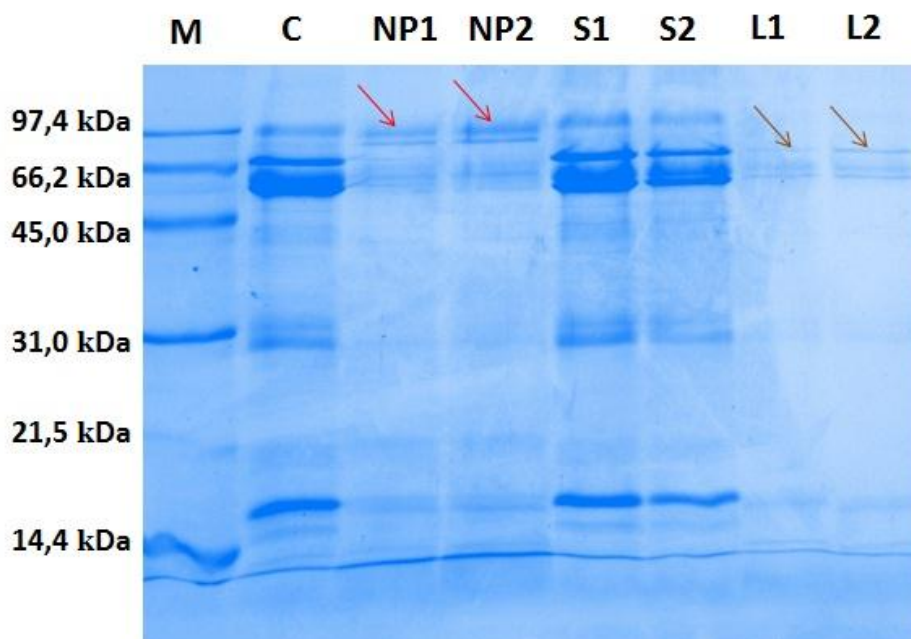


Figura 21 - Gel SDS-PAGE - Incubação de NPs@EDTA em Saliva; M – Marcador de peso molecular; C – Amostra de saliva controle; NP1, NP2- - Proteínas-que ligaram às NPs@EDTA após incubação em saliva (duplicado); S1, S2 - Sobrenadantes da incubação das NPs@EDTA na saliva (duplicado); L1, L2 – Proteínas na solução de primeira lavagem das NPs@EDTA após incubação em saliva (duplicado)

Na Figura 21 é possível observar nos controlos uma região com uma grande quantidade de proteína a aproximadamente 60kDa, que indica a presença de amilase, como seria esperado. Comparando os controlos com os resultados obtidos em duplicado com as NPs@EDTA verifica-se que nas NPs esta banda é muito ténue, quase inexistente. Por outro lado, verifica-se uma intensificação na zona dos 90 kDa, cujas bandas podem representar um enriquecimento em MMP9, uma vez que a MMP9 tem pesos moleculares de 92 kDa e 82 kDa [238]. Outro fator que demonstra a especificidade das NPs é o aparecimento de bandas na ordem dos 60 kDa indicando que estão a ser eliminadas apenas proteínas que se encontravam ligadas às NPs de forma não específica.

Tabela 8 - Constantes de afinidade entre os iões metálicos e o EDTA (temperatura de 20 °C e força iónica 0,1)
[240]

Ião metálico	Constante de afinidade (K_{mv})	Ião metálico	Constante de afinidade (K_{mv})
Ag^+	$2,1 \times 10^7$	Al^{3+}	$1,3 \times 10^{16}$
Mg^{2+}	$4,9 \times 10^8$	Cd^{2+}	$2,9 \times 10^{16}$
Ba^{2+}	$5,8 \times 10^7$	Pb^{2+}	$1,1 \times 10^{18}$
Sr^{2+}	$4,3 \times 10^8$	Ni^{2+}	$4,2 \times 10^{18}$
Ca^{2+}	$5,0 \times 10^{10}$	Cu^{2+}	$6,3 \times 10^{18}$
Mn^{2+}	$6,2 \times 10^{13}$	Hg^{2+}	$6,3 \times 10^{21}$
Fe^{2+}	$2,1 \times 10^{14}$	Th^{4+}	$1,6 \times 10^{23}$
Co^{2+}	$2,0 \times 10^{16}$	Fe^{3+}	$1,3 \times 10^{25}$
Zn^{2+}	$3,2 \times 10^{16}$	V^{3+}	$7,9 \times 10^{25}$

Apesar de ser esperado que várias enzimas presentes na saliva interagissem com os grupos –COOH com atividade quelante presente na superfície das NPs, os resultados obtidos na Figura 21 sugerem alguma especificidade das interações das NPs com as enzimas de elevado peso molecular (essencialmente na ordem de 90 kDa).

Este facto pode ser explicado pela variação da afinidade dos grupos –COOH quelantes com os diferentes iões catalíticos presentes no centro ativo das enzimas (a Tabela 8 mostra a variação para o caso das moléculas de EDTA). A variação da disponibilidade do ião catalítico para interagir com os –COOH também poderá influenciar as interações entre as NPs e as metaloproteínas.

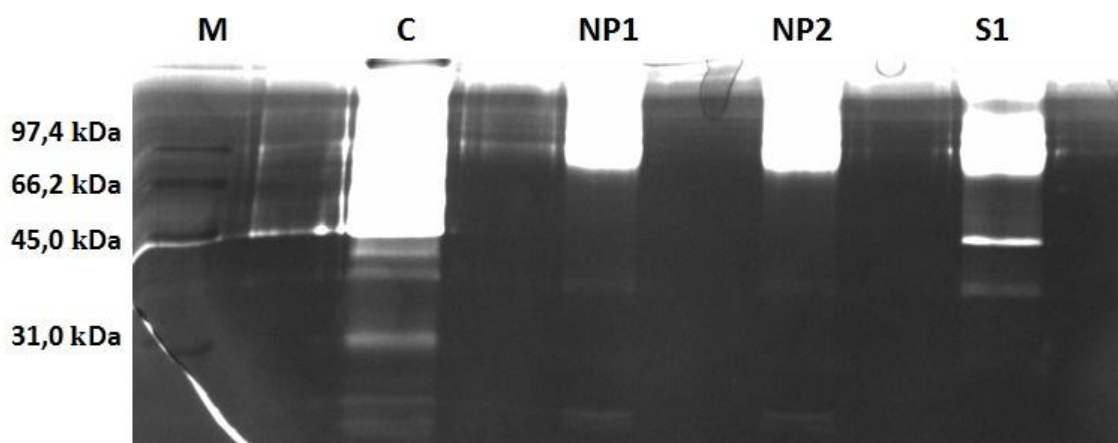


Figura 22 - Zimografia com Gelatina de NPs@EDTA; M- Marcador de peso molecular; C – controlo (saliva); NP1/NP2 – Proteínas ligadas às NP em duplicado; S1 – Sobrenadante de incubação das NPs na Saliva.

No zimograma da Figura 22, é possível observar a existência de atividade enzimática na zona de elevados pesos moleculares em todas as amostras. Quando comparados os

resultados de atividade obtidos na amostra controle, com os obtidos no sobrenadante de incubação, é possível observar uma diminuição de atividade catalítica, indicando uma diminuição da quantidade de enzimas degradadoras de gelatina. O zimograma da Figura 22 permite assim validar a presença de MMPs ligadas especificamente às NPs@EDTA

3.3.Enriquecimento de proteases serínicas– NPs@Aprotinina (Etapa5)

As proteases serínicas são a classe mais estudada em enzimologia. Dentro desta classe de proteases existem as calicreínas, um subgrupo desta classe de proteases, responsáveis por diversos processos fisiológicos. Neste ensaio foram utilizadas NPs@Aprotinina e tentou-se avaliar por SDS-PAGE a capacidade destas interagirem especificamente com proteínas presentes na saliva e assim permitir o enriquecimento destas proteínas. A aprotinina é um inibidor específico de proteases serínicas e apresenta capacidade para inibir um grande número de proteases existentes na saliva. Na Tabela 9 encontra-se uma lista das enzimas e respetivo EC/peso molecular existentes na saliva que interagem com a aprotinina inibindo a sua atividade.

Tabela 9 - Lista de enzimas existentes na saliva sob as quais a aprotinina apresenta capacidade inibitória (dados BRENDA e Uniprot) [238, 241]

Nome	Número E.C.	Peso Molecular
Tripsina	3.4.21.4	26,5 kDa
Calicreína 12	3.4.21.B43	26,7 kDa
Calicreína 4	3.4.21.B12	27 kDa
Quimase I	3.4.21.39	27,3 kDa
Calicreína 7	3.4.21.117	27,5 kDa
Calicreína 8 -	3.4.21.118	28 kDa
Calicreína 2	3.4.21.35	28,5 kDa
Calicreína 3	3.4.21.77	28,7 kDa
Granzima A	3.4.21.78	29 kDa
Calicreína 6	3.4.21.B10	30 kDa
Triptase	3.4.21.59	30,5 kDa
Calicreína 11	3.4.21.B42	31 kDa
Desoxirribonuclease I	3.1.21.1	31,4 kDa
Prostasina	3.4.21.B6	36,7 kDa
Ativador de t-plasminogéneo	3.4.21.68	58,3 kDa
Calicreína plasmática	3.4.21.34	71,3 kDa
Proil oligopeptidase	3.4.21.26	80 kDa
Matriptase	3.4.21.109	94,7 kDa

De forma a avaliar a especificidade da interação das NPs@aprotinina com as proteínas existentes na saliva, estas foram incubadas em saliva durante 4 horas e posteriormente lavadas diversas vezes de forma a eliminar as enzimas ligadas às NPs por interações não específicas e correu-se um gel SDS-PAGE das NPs.

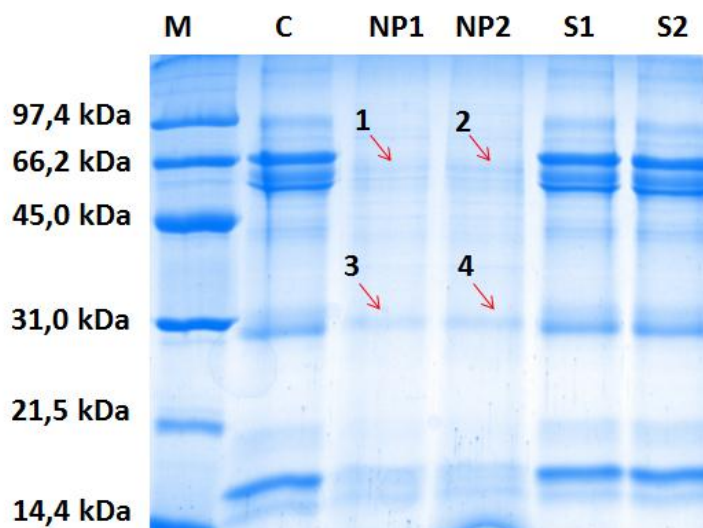


Figura 23- Gel SDS-PAGE - Incubação de NPs@aprotinina em Saliva; M – Marcador de peso molecular; C – Amostra de saliva controlo; NP1, NP2 - Proteínas-que ligaram às NPs@aprotinina após incubação em saliva (duplicado); S1,S2 – Sobrenadante de incubação das NPs@aprotinina em saliva (duplicado)

Tal como se procedeu para as NPs@EDTA, foram comparados os perfis proteicos obtidos por SDS-PAGE após incubação da magnetite (etapa 1) e das NPs@aprotinina em saliva. Comparando o perfil das proteínas que interagem com a magnetite (Figura 20) com o perfil proteico das NPs@aprotinina (Figura 23) é possível verificar que apesar de ambos os sistemas apresentarem um perfil parecido, observa-se um atenuamento/desaparecimento de algumas bandas obtidas podendo indicar alguma especificidade das NPs@aprotinina. Analisando a Figura 23 observa-se que a banda associada à amilase é quase inexistente nas amostras NP1 e NP2 sendo possível constatar que as NPs@aprotinina não interagem com a amilase. Os resultados obtidos nas amostras NP1 e NP2 mostram o aparecimento de bandas na zona dos 60 kDa (1 e 2) e 30 kDa (3 e 4) podendo estas bandas corresponder a algumas das enzimas presentes na Tabela 9 indiciando assim alguma especificidade do sistema de caracterização em estudo.

De forma a validar a especificidade da interação das NPs@aprotinina e NPs@EDTA com as enzimas de interesse, as bandas obtidas nos géis de eletroforese foram

digeridas com tripsina e posteriormente analisadas por espectrometria de massa (MS/MS). Contudo, a espectrometria de massa não permitiu a identificação das proteínas presentes nas bandas referidas, que para além apresentarem pouca quantidade de proteína (densidade ótica baixa), cada banda pode corresponder a várias proteínas, como previamente identificado [242] sendo necessário realizar uma análise por LC-MS/MS.

A análise proteômica da saliva apresenta vantagens, pois a saliva contém uma grande variedade de proteínas conferindo-lhe assim um grande potencial na procura de biomarcadores. No entanto uma grande desvantagem da utilização da saliva em estudos proteômicos é a existência de proteínas abundantes como: anidrase carbónica, mucinas, proteínas ricas em prolina, amilase entre outras, devido à sua elevada abundância estas proteínas dificultam a caracterização de proteínas menos abundantes [243]. Os resultados obtidos para as NPs@EDTA e para as NPs@aprotinina demonstram que foi possível a criação de um sistema específico, robusto (apresentando atividade mesmo na presença de agentes caotrópicos) e sensível que permitiu a obtenção de uma fração enriquecida da amostra biológica em estudo (saliva), uma vez que muitas das bandas obtidas no controlo (inclusive as mais proeminentes) não foram observadas nos resultados das NPs, não se tendo observado a presença de algumas bandas características da saliva, como a amilase. Assim, ambos os sistemas em estudo neste trabalho mostraram-se eficazes e a sua aplicação no desenvolvimento de sistemas de caracterização de proteases mostra-se bastante promissora.

4. Conclusões e Perspetivas Futuras

Com o intuito de desenvolver um sistema simples e eficaz com base em nanopartículas magnéticas acopladas a inibidores específicos de proteases que permita a caracterização de proteases, sintetizaram-se e funcionalizaram-se nanopartículas magnéticas que permitam o acoplamento de inibidores específicos de proteases à sua superfície para posterior aplicação na caracterização de proteases presentes em biofluidos. Os resultados obtidos permitiram tirar as seguintes conclusões:

- i) Foi possível a síntese de nanopartículas de magnetite superparamagnética pelo método da co-precipitação e o seu revestimento com uma capa protetora de sílica (SiO_2);
- ii) Conseguiu-se através da ligação amida por ativação por carbodiimida, funcionalizar a superfície das NPs com grupos $-\text{COOH}$ derivados da molécula de EDTA, garantindo assim um elevado número de grupos reativos à superfície das NPs.
- iii) O acoplamento às NPs de ambos os inibidores em estudo, EDTA-TMS e aprotinina, foi efetuado com sucesso, obtendo-se os sistemas NPs@EDTA e NPs@aprotinina, respetivamente.
- iv) A aplicação das NPs@EDTA permitiu a obtenção de frações enriquecidas em metaloproteínas, tanto no caso de amostras simples (soluções de proteínas) como em amostras complexas (saliva); Tal como no caso das NPs@EDTA, também as NPs@aprotinina se mostraram capazes de interagir especificamente com proteínas existentes na saliva.
- v) Por fim, ambos os sistemas em estudo se mostraram eficazes, sensíveis, rápidos e no caso das NPs@EDTA apresentaram especificidade e capacidade de enriquecimento de metaloproteínas mesmo na presença de agentes caotrópicos.

De um modo geral, o acoplamento de inibidores específicos de proteases permitiu o enriquecimento específico de proteínas existentes numa amostra de forma rápida, sensível e robusta. No futuro, a aplicação de NPs@inibidores em sistemas de caracterização de proteases mostra-se bastante promissora.

Como perspectiva futura deverá ser testada a utilização das NPs acopladas a inibidores em outros biofluidos e até mesmo em biofluidos sem qualquer pré-tratamento de forma a avaliar a influência de fatores como a viscosidade na capacidade de enriquecimento do sistema. Outra perspectiva de trabalho futuro a testar, é a incubação das NPs@EDTA numa solução contendo iões Fe^{3+} , e avaliar a possibilidade de obtenção de enzimas funcionais após aplicação deste sistema. Também no futuro, poderão ser feitas várias incubações consecutivas na mesma amostra, de forma a avaliar se as NPs funcionalizadas com inibidores de largo espectro (p.e. EDTA) apresentam uma capacidade de purificação de enzimas com base na afinidade entre a proteína e a matriz, tal como acontece nas cromatografias de afinidade. Deverá também ser testado o comportamento das NPs@ SiO_2 e quais as interações que realiza com as proteínas existentes nos biofluidos. Também, deverão ser procuradas novas funcionalizações que diminuam o número de passos envolvidos na preparação das NPs@inibidores e/ou aumentem a sua eficiência. Por fim, torna-se fulcral o desenvolvimento futuro de um sistema de silanização mais eficiente que permita a proteção do núcleo magnético de condições de funcionalização agressivas.

5. Referências

1. Nath, N. and Chilkoti, A., *A Colorimetric Gold Nanoparticle Sensor To Interrogate Biomolecular Interactions in Real Time on a Surface*. Analytical Chemistry, 2001. 74(3): p. 504-509.
2. Cheon, J. and Lee, J.-H., *Synergistically Integrated Nanoparticles as Multimodal Probes for Nanobiotechnology*. Accounts of Chemical Research, 2008. 41(12): p. 1630-1640.
3. Ferrari, M., *Cancer nanotechnology: opportunities and challenges*. Nature Review cancer, 2005(1474-175X (Print)).
4. Schladt, T.D., Schneider, K., Schild, H., and Tremel, W., *Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment*. Dalton Transactions, 2011. 40(24): p. 6315-6343.
5. Kalkan, N.A., Aksoy, S., Aksoy, E.A., and Hasirci, N., *Preparation of chitosan-coated magnetite nanoparticles and application for immobilization of laccase*. Journal of Applied Polymer Science, 2012. 123(2): p. 707-716.
6. Johnson, A., Zawadzka, A., Deobald, L., Crawford, R., and Paszczynski, A., *Novel method for immobilization of enzymes to magnetic nanoparticles*. Journal of Nanoparticle Research, 2008. 10(6): p. 1009-1025.
7. Clement O Fau - Siauve, N., Siauve N Fau - Lewin, M., Lewin M Fau - de Kerviler, E., de Kerviler E Fau - Cuenod, C.A., Cuenod Ca Fau - Frija, G., and Frija, G., *Contrast agents in magnetic resonance imaging of the liver: present and future*. (0753-3322 (Print)).
8. Sahu, S., Chakrabarty, A., Bhattacharya, D., Ghosh, S., and Pramanik, P., *Single step surface modification of highly stable magnetic nanoparticles for purification of His-tag proteins*. Journal of Nanoparticle Research, 2011. 13(6): p. 2475-2484.
9. Cerdan, S., Lötscher, H.R., Künnecke, B., and Seelig, J., *Monoclonal antibody-coated magnetite particles as contrast agents in magnetic resonance imaging of tumors*. Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine, 1989. 12(2): p. 151-163.
10. Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A.K., and Zweck, A., *The emerging nanomedicine landscape*. Nature Biotechnology, 2006. 24(10): p. 1211-7.
11. Sun, C., Lee, J.S., and Zhang, M., *Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery*. Advanced Drug Delivery Review, 2008. 60(11): p. 1252-65.
12. Buzea, C., Pacheco, I., and Robbie, K., *Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity*. Biointerphases, 2007. 2(4): p. MR17-MR71.
13. Yanhong, L., Dejun, W., Qidong, Z., Min, Y., and Qinglin, Z., *A Study of Quantum Confinement Properties of Photogenerated Charges in ZnO Nanoparticles by Surface Photovoltage Spectroscopy*. The Journal of Physical Chemistry B, 2004. 108(10): p. 3202-3206.
14. Kottmann, J., Martin, O., Smith, D., and Schultz, S., *Spectral response of plasmon resonant nanoparticles with a non-regular shape*. Optics Express, 2000. 6(11): p. 213-9.
15. Lin, C. and Ge, J., *Multifunctional polyethylenimine-conjugated superparamagnetic nanoparticles for drug delivery and imaging*. Journal of Controlled Release, 2011. 152 Suppl 1: p. e58-60.

16. Wahajuddin and Arora, S., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers*. International Journal of Nanomedicine, 2012. 7: p. 3445-3471.
17. Yu, F. and Yang, V.C., *Size-tunable synthesis of stable superparamagnetic iron oxide nanoparticles for potential biomedical applications*. Journal Biomedical Materials Research A, 2010. 92(4): p. 1468-75.
18. Singh, N., Jenkins, G.J., Asadi, R., and Doak, S.H., *Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION)*. Nano Reviews, 2010. 1.
19. Tito Trindade and Ana Luísa Daniel-Da-Silva (2011). Biofunctional Composites of Polysaccharides Containing Inorganic Nanoparticles, A.i.N.T., Abbass Hashim (Ed.), ISBN: 978-953-307-347-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/biofunctional-composites-of-polysaccharides-containing-inorganic-nanoparticles>.
20. Chang, J.H., Lee, J., Jeong, Y., Lee, J.H., Kim, I.J., and Park, S.E., *Hydrophobic partitioning approach to efficient protein separation with magnetic nanoparticles*. Analytical Biochemistry, 2010. 405(1): p. 135-137.
21. Arruebo, M., Fernandez-Pacheco, R., Ibarra, M.R., and Santamaria, J., *Magnetic nanoparticles for drug delivery*. Nano Today, 2007. 2(3): p. 22-32.
22. Ito, A., Takizawa, Y., Honda, H., Hata, K.I., Kagami, H., Ueda, M., and Kobayashi, T., *Tissue engineering using magnetite nanoparticles and magnetic force: Heterotypic layers of cocultured hepatocytes and endothelial cells*. Tissue Engineering, 2004. 10(5-6): p. 833-840.
23. Liu, J.F., Zhao, Z.S., and Jiang, G.B., *Coating Fe₃O₄ magnetic nanoparticles with humic acid for high efficient removal of heavy metals in water*. Environmental Science & Technology, 2008. 42(18): p. 6949-6954.
24. Lang, C., Schuler, D., and Faivre, D., *Synthesis of magnetite nanoparticles for bio- and nanotechnology: Genetic engineering and biomimetics of bacterial magnetosomes*. Macromolecular Bioscience, 2007. 7(2): p. 144-151.
25. Bruce, I.J. and Sen, T., *Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxysilanes and their application in magnetic bioseparations*. Langmuir, 2005. 21(15): p. 7029-35.
26. Duguet, E., Vasseur, S., Mornet, S., and Devoisselle, J.M., *Magnetic nanoparticles and their applications in medicine*. Nanomedicine (Lond), 2006. 1(2): p. 157-68.
27. Kaushik, A., Khan, R., Solanki, P.R., Pandey, P., Alam, J., Ahmad, S., and Malhotra, B.D., *Iron oxide nanoparticles-chitosan composite based glucose biosensor*. Biosensors & Bioelectronics, 2008. 24(4): p. 676-83.
28. Fang, C. and Zhang, M., *Multifunctional Magnetic Nanoparticles for Medical Imaging Applications*. Journal of Materials Chemistry, 2009. 19: p. 6258-6266.
29. McCarthy, J.R., Kelly, K.A., Sun, E.Y., and Weissleder, R., *Targeted delivery of multifunctional magnetic nanoparticles*. Nanomedicine (Lond), 2007. 2(2): p. 153-67.
30. Lei, L., Bai, Y.X., Li, Y.F., Yi, L.X., Yang, Y., and Xia, C.G., *Study on immobilization of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2009. 321(4): p. 252-258.

31. Yong, Y., Bai, Y.X., Li, Y.F., Lin, L., Cui, Y.J., and Xia, C.G., *Characterization of Candida rugosa lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity*. *Process Biochemistry*, 2008. 43(11): p. 1179-1185.
32. Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., and Muller, R.N., *Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications*. *Chemical Review*, 2008. 108(6): p. 2064-110.
33. Chang, J.H., Kang, K.H., Choi, J., and Jeong, Y.K., *High efficiency protein separation with organosilane assembled silica coated magnetic nanoparticles*. *Superlattices and Microstructures*, 2008. 44(4-5): p. 442-448.
34. Lin, P.C., Chen, S.H., Wang, K.Y., Chen, M.L., Adak, A.K., Hwu, J.R., Chen, Y.J., and Lin, C.C., *Fabrication of oriented antibody-conjugated magnetic nanoprobe and their immunoaffinity application*. *Analytical Chemistry*, 2009. 81(21): p. 8774-82.
35. Guven, B., Boyaci, I.H., Tamer, U., and Calik, P., *A rapid method for detection of genetically modified organisms based on magnetic separation and surface-enhanced Raman scattering*. *Analyst*, 2012. 137(1): p. 202-8.
36. Santoni, V., Molloy, M., and Rabilloud, T., *Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible?* *Electrophoresis*, 2000. 21(6): p. 1054-1070.
37. Cao, M., Li, Z.H., Wang, J.L., Ge, W.P., Yue, T.L., Li, R.H., Colvin, V.L., and Yu, W.W., *Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis*. *Trends in Food Science & Technology*, 2012. 27(1): p. 47-56.
38. Garcia, J., Zhang, Y., Taylor, H., Cespedes, O., Webb, M.E., and Zhou, D.J., *Multilayer enzyme-coupled magnetic nanoparticles as efficient, reusable biocatalysts and biosensors*. *Nanoscale*, 2011. 3(9): p. 3721-3730.
39. Okoli, C., Boutonnet, M., Jaras, S., and Rajarao-Kuttuva, G., *Protein-functionalized magnetic iron oxide nanoparticles: time efficient potential-water treatment*. *Journal of Nanoparticle Research*, 2012. 14(10).
40. Zhang, L., Lu, H., and Yang, P., *Recent developments of nanoparticle-based enrichment methods for mass spectrometric analysis in proteomics*. *SCIENCE CHINA Chemistry*, 2010. 53(4): p. 695-703.
41. Wu, H.-T., Hsu, C.-C., Tsai, C.-F., Lin, P.-C., Lin, C.-C., and Chen, Y.-J., *Nanoprobe-based immobilized metal affinity chromatography for sensitive and complementary enrichment of multiply phosphorylated peptides*. *Proteomics*, 2011. 11(13): p. 2639-2653.
42. Ferreira, J.A., Daniel-da-Silva, A.L., Alves, R.M., Duarte, D., Vieira, I., Santos, L.L., Vitorino, R., and Amado, F., *Synthesis and optimization of lectin functionalized nanoprobe for the selective recovery of glycoproteins from human body fluids*. *Analytical Chemistry*, 2011. 83(18): p. 7035-43.
43. Chen, C.-T. and Chen, Y.-C., *Fe₃O₄/TiO₂ Core/Shell Nanoparticles as Affinity Probes for the Analysis of Phosphopeptides Using TiO₂ Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2005. 77(18): p. 5912-5919.
44. Chen, C.T. and Chen, Y.C., *A two-matrix system for MALDI MS analysis of serine phosphorylated peptides concentrated by Fe₃O₄/Al₂O₃ magnetic nanoparticles*. *Journal Mass Spectrometry*, 2008. 43(4): p. 538-41.

45. Zhou, W., Yao, N., Yao, G., Deng, C., Zhang, X., and Yang, P., *Facile synthesis of aminophenylboronic acid-functionalized magnetic nanoparticles for selective separation of glycopeptides and glycoproteins*. Chemical Communications (Camb), 2008(43): p. 5577-9.
46. Ferreira, J.A., Daniel-da-Silva, A.L., Alves, R.M.P., Duarte, D., Vieira, I., Santos, L.L., Vitorino, R., and Amado, F., *Synthesis and Optimization of Lectin Functionalized Nanoprobes for the Selective Recovery of Glycoproteins from Human Body Fluids*. Analytical Chemistry, 2011. 83(18): p. 7035-7043.
47. Amado, F.M.L., Ferreira, R.P., and Vitorino, R., *One decade of salivary proteomics: Current approaches and outstanding challenges*. Clinical Biochemistry, (0).
48. Veenstra, T.D., Conrads, T.P., Hood, B.L., Avellino, A.M., Ellenbogen, R.G., and Morrison, R.S., *Biomarkers: Mining the biofluid proteome*. Molecular & Cellular Proteomics, 2005. 4(4): p. 409-418.
49. Granger, D.A., Kivlighan, K.T., Fortunato, C., Harmon, A.G., Hibel, L.C., Schwartz, E.B., and Whembolua, G.L., *Integration of salivary biomarkers into developmental and behaviorally-oriented research: Problems and solutions for collecting specimens*. Physiology & Behavior, 2007. 92(4): p. 583-590.
50. Caseiro, A., Vitorino, R., Barros, A.S., Ferreira, R., Calheiros-Lobo, M.J., Carvalho, D., Duarte, J.A., and Amado, F., *Salivary peptidome in type 1 diabetes mellitus*. Biomedical Chromatography, 2012. 26(5): p. 571-582.
51. Cabras, T., Pisano, E., Mastinu, A., Denotti, G., Pusceddu, P.P., Inzitari, R., Fanali, C., Nemolato, S., Castagnola, M., and Messana, I., *Alterations of the Salivary Secretory Peptidome Profile in Children Affected by Type 1 Diabetes*. Molecular & Cellular Proteomics, 2010. 9(10): p. 2099-2108.
52. Baldini, C., Giusti, L., Bazzichi, L., Lucacchini, A., and Bombardieri, S., *Proteomic analysis of the saliva: A clue for understanding primary from secondary Sjogren's syndrome?* Autoimmunity Reviews, 2008. 7(3): p. 185-191.
53. Giusti, L., Baldini, C., Bazzichi, L., Ciregia, F., Tonazzini, I., Mascia, G., Giannaccini, G., Bombardier, S., and Lucacchini, A., *Proteome analysis of whole saliva: A new tool for rheumatic diseases - the example of Sjogren's syndrome*. Proteomics, 2007. 7(10): p. 1634-1643.
54. Goncalves, L.D., Soares, M.R., Nogueira, F.C.S., Garcia, C., Camisasca, D.R., Domont, G., Feitosa, A.C.R., Pereira, D.D., Zingali, R.B., and Alves, G., *Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients*. Journal of Proteomics, 2010. 73(7): p. 1334-1341.
55. Haigh, B.J., Stewart, K.W., Whelan, J.R.K., Barnett, M.P.G., Smolenski, G.A., and Wheeler, T.T., *Alterations in the salivary proteome associated with periodontitis*. Journal of Clinical Periodontology, 2010. 37(3): p. 241-247.
56. Sas, R. and Dawes, C., *The intra-oral distribution of unstimulated and chewing-gum-stimulated parotid saliva*. Archives of Oral Biology, 1997. 42(7): p. 469-474.
57. Sun, Q.F., Sun, Q.H., Du, J., and Wang, S., *Differential gene expression profiles of normal human parotid and submandibular glands*. Oral Diseases, 2008. 14(6): p. 500-509.
58. Pfaffe, T., Cooper-White, J., Beyerlein, P., Kostner, K., and Punyadeera, C., *Diagnostic Potential of Saliva: Current State and Future Applications*. Clinical Chemistry, 2011. 57(5): p. 675-687.

59. Loo, J.A., Yan, W., Ramachandran, P., and Wong, D.T., *Comparative Human Salivary and Plasma Proteomes*. Journal Dental Research, 2010. 89(10): p. 1016-1023.
60. Amado, F., Lobo, M.J.C., Domingues, P., Duarte, J.A., and Vitorino, R., *salivary peptidomics*. Expert Review of Proteomics, 2010. 7(5): p. 709-721.
61. Jensen, J.L., Xu, T., Lamkin, M.S., Brodin, P., Aars, H., Berg, T., and Oppenheim, F.G., *Physiological regulation of the secretion of histatins and statherins in human parotid saliva*. Journal of Dental Research, 1994. 73(12): p. 1811-7.
62. McArthur, C., Sanson, G.D., and Beal, A.M., *Salivary proline-rich proteins in mammals: Roles in oral homeostasis and counteracting dietary tannin*. Journal of Chemical Ecology, 1995. 21(6): p. 663-691.
63. Ito, T., Komiya-Ito, A., Arataki, T., Furuya, Y., Yajima, Y., Yamada, S., Okuda, K., and Kato, T., *Relationship between antimicrobial protein levels in whole saliva and periodontitis*. Journal of Periodontology, 2008. 79(2): p. 316-22.
64. Nebert, D.W., *Proposed role of drug-metabolizing enzymes: regulation of steady state levels of the ligands that effect growth, homeostasis, differentiation, and neuroendocrine functions*. Molecular Endocrinology, 1991. 5(9): p. 1203-14.
65. Skalova, L., Szotakova, B., Wsol, V., Kral, R., Baliharova, V., and Lamka, J., *Activity, stereospecificity, and stereoselectivity of microsomal enzymes in dependence on storage and freezing of rat liver samples*. Chirality, 2000. 12(9): p. 649-53.
66. Rich, J.O. and Dordick, J.S., *Controlling regioselectivity in enzyme-catalyzed acylation of polyhydroxyl compounds*. Enzyme Engineering Xiii, 1996. 799: p. 226-30.
67. Bairoch, A., *The ENZYME database in 2000*. Nucleic Acids Research, 2000. 28(1): p. 304-5.
68. Patel, T., Gores, G.J., and Kaufmann, S.H., *The role of proteases during apoptosis*. Faseb Journal, 1996. 10(5): p. 587-97.
69. Liotta, L., *The role of cellular proteases and their inhibitors in invasion and metastasis. Introductory overview*. Cancer Metastasis Rev, 1990. 9(4): p. 285-7.
70. Iakimova, E.T., Woltering, E.J., Kapchina-Toteva, V.M., Harren, F.J.M., and Cristescu, S.M., *Cadmium toxicity in cultured tomato cells - Role of ethylene, proteases and oxidative stress in cell death signaling*. Cell Biology International, 2008. 32(12): p. 1521-1529.
71. De Strooper, B., *Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process*. Physiological Reviews, 2010. 90(2): p. 465-94.
72. Carnevale, R.P., Proietti, C.J., Salatino, M., Urtreger, A., Peluffo, G., Edwards, D.P., Boonyaratanakornkit, V., Charreau, E.H., Bal de Kier Joffe, E., Schillaci, R., and Elizalde, P.V., *Progestin effects on breast cancer cell proliferation, proteases activation, and in vivo development of metastatic phenotype all depend on progesterone receptor capacity to activate cytoplasmic signaling pathways*. Molecular Endocrinology, 2007. 21(6): p. 1335-58.
73. Gaspar, A., Skosey, J.L., Sequeira, W., and Teodorescu, M., *Detection of alpha 2-macroglobulin-associated proteases in the plasma of patients with rheumatoid arthritis*. Clinical Chemistry, 1984. 30(9): p. 1517-22.
74. Hartley, B.S., *Proteolytic enzymes*. Annual Review of Biochemistry, 1960. 29: p. 45-72.
75. Barret, A.J., *In Protein degradation in health and disease*. 1980(0300-5208 (Print)).

76. *Proteinase inhibitors / editors, A.J. Barrett and G. Salvesen. Research monographs in cell and tissue physiology ; v. 12, ed. A.J. Barrett and G. Salvesen*1986, Amsterdam ; New York :: Elsevier.
77. Baird, T.T., Jr., Wright, W.D., and Craik, C.S., *Conversion of trypsin to a functional threonine protease*. Protein Science, 2006. 15(6): p. 1229-38.
78. Hedstrom, L., *Serine protease mechanism and specificity*. Chemical Reviews, 2002. 102(12): p. 4501-24.
79. Beynon, R. and Bond, J.S., *Proteolytic Enzymes: A practical approach*2001: oxford university press.
80. Bender, M.L. and Kezdy, F.J., *Mechanism of Action of Proteolytic Enzymes*. Annual Review of Biochemistry, 1965. 34(1): p. 49-76.
81. Fersht, A.R., Blow, D.M., and Fastrez, J., *Leaving group specificity in the chymotrypsin-catalyzed hydrolysis of peptides. A stereochemical interpretation*. Biochemistry, 1973. 12(11): p. 2035-41.
82. G, L., *The Cysteine proteinases*. Tetrahedron, 1976. 32(3): p. 291-302.
83. Walsh, C., *Proteases: Hydrolysis of Peptide Bonds: Specificity and Mechanism*.
84. Beveridge, A.J. and Heywood, G.C., *A Quantum-Mechanical Study of the Active-Site of Aspartic Proteinases*. Biochemistry, 1993. 32(13): p. 3325-3333.
85. László, P., *The mechanism of action of aspartic proteases involves 'push-pull' catalysis*. Febs Letters, 1987. 219(1): p. 1-4.
86. Pelmenschikov, V. and Siegbahn, P.E.M., *Catalytic Mechanism of Matrix Metalloproteinases: Two-Layered ONIOM Study*. Inorganic Chemistry, 2002. 41(22): p. 5659-5666.
87. Liton, P.B., Gonzalez, P., and Epstein, D.L., *The role of proteolytic cellular systems in trabecular meshwork homeostasis*. Experimental Eye Research, 2009. 88(4): p. 724-8.
88. Wagner, U., Hadge, D., Gudmundsdottir, B.K., Nold, K., and Drossler, K., *Antibody response in salmonids against the 70 kDa serine protease of Aeromonas salmonicida studied by a monoclonal antibody-based ELISA*. Veterinary Immunology Immunopathology, 2001. 82(1-2): p. 121-35.
89. Varina, M., Denkin, S.M., Staroscik, A.M., and Nelson, D.R., *Identification and Characterization of Epp, the Secreted Processing Protease for the Vibrio anguillarum EmpA Metalloprotease*. Journal of Bacteriology, 2008. 190(20): p. 6589-6597.
90. Wu, Y., Li, Q., and Chen, X.Z., *Detecting protein-protein interactions by Far western blotting*. Nature Protocols, 2007. 2(12): p. 3278-84.
91. Lantz, M.S. and Ciborowski, P., [45] *Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases*, in *Methods in Enzymology*, P.M.B. Virginia L. Clark, Editor 1994, Academic Press. p. 563-594.
92. Kostallas, G. and Samuelson, P., *Novel fluorescence-assisted whole-cell assay for engineering and characterization of proteases and their substrates*. Applied Environmental Microbiology, 2010. 76(22): p. 7500-8.

93. Huston, A.L., Methe, B., and Deming, J.W., *Purification, characterization, and sequencing of an extracellular cold-active aminopeptidase produced by marine psychrophile Colwellia psychrerythraea strain 34H*. Applied Environmental Microbiology, 2004. 70(6): p. 3321-8.
94. Vanaman, T.C. and Bradshaw, R.A., *Proteases in cellular regulation minireview series*. Journal Biological Chemistry, 1999. 274(29): p. 20047.
95. Umezawa, H., *Low-Molecular-Weight Enzyme-Inhibitors of Microbial Origin*. Annual Review of Microbiology, 1982. 36: p. 75-99.
96. Docherty, K., Hutton, J.C., and Steiner, D.F., *Cathepsin B-related proteases in the insulin secretory granule*. Journal Biological Chemistry, 1984. 259(10): p. 6041-4.
97. Mattler, L.E. and Bang, N.U., *Serine protease specificity for peptide chromogenic substrates*. Thrombosis Haemostasis, 1977. 38(4): p. 776-92.
98. Wang, H., Li, T., Zou, H., Zhang, Y., Chao, J., and Chao, L., *The purification of human urinary kallikrein with ion-exchange radial flow membrane chromatography*. Biomedical Chromatography, 1996. 10(3): p. 139-43.
99. Canduri, F., Ward, R.J., de Azevedo, W.F., Gomes, R.A.S., and Arni, R.K., *Purification and partial characterization of cathepsin D from porcine (Sus scrofa) liver using affinity chromatography*. Biochemistry and Molecular Biology International, 1998. 45(4): p. 797-803.
100. FUJIMOTO, Y., MORIYA, H., and MORIWAKI, C., *Studies on Human Salivary Kallikrein*. Journal Biochemistry, 1973. 74(2): p. 239-246.
101. Reeck, G.R., Walsh, K.A., and Neurath, H., *Isolation and characterization of carboxypeptidases A and B from activated pancreatic juice*. Biochemistry, 1971. 10(25): p. 4690-4698.
102. Afting, E.G. and Recker, M.L., *Two-step affinity-chromatographic purification of cathepsin D from pig myometrium with high yield*. Biochemistry Journal, 1981. 197(2): p. 519-22.
103. Hibino, T., Fujita, E., Tsuji, Y., Nakanishi, J., Iwaki, H., Katagiri, C., and Momoi, T., *Purification and characterization of active caspase-14 from human epidermis and development of the cleavage site-directed antibody*. Journal Cellular Biochemistry, 2010. 109(3): p. 487-97.
104. Pereira, M.E., Yu, B., and Wilk, S., *Enzymatic Changes of the Bovine Pituitary Multicatalytic Proteinase Complex, Induced by Magnesium-Ions*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1992. 294(1): p. 1-8.
105. Zhang, W., *Involvement of protein degradation, calpain autolysis and protein nitrosylation in fresh meat quality during early postmortem refrigerated storage*. Animal Science 2009.
106. Denny, P., Hagen, F.K., Hardt, M., Liao, L.J., Yan, W.H., Arellanno, M., Bassilian, S., Bedi, G.S., Boonthueung, P., Cociorva, D., Delahunty, C.M., Denny, T., Dunsmore, J., Faull, K.F., Gilligan, J., Gonzalez-Begne, M., Halgand, F., Hall, S.C., Han, X.M., Henson, B., Hewel, J., Hu, S., Jeffrey, S., Jiang, J., Loo, J.A., Loo, R.R.O., Malamud, D., Melvin, J.E., Miroshnychenko, O., Navazesh, M., Niles, R., Park, S.K., Prakobphol, A., Ramachandran, P., Richert, M., Robinson, S., Sondej, M., Souda, P., Sullivan, M.A., Takashima, J., Than, S., Wang, J.H., Whitelegge, J.P., Witkowska, H.E., Wolinsky, L., Xie, Y.M., Xu, T., Yu, W.X., Ytterberg, J., Wong, D.T., Yates, J.R., and Fisher, S.J., *The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions*. Journal Proteome Research, 2008. 7(5): p. 1994-2006.

107. Xie, H., Rhodus, N.L., Griffin, R.J., Carlis, J.V., and Griffin, T.J., *A catalogue of human saliva proteins identified by free flow electrophoresis-based peptide separation and tandem mass spectrometry*. Molecular Cellular Proteomics, 2005. 4(11): p. 1826-30.
108. Chokki, M., Yamamura, S., Eguchi, H., Masegi, T., Horiuchi, H., Tanabe, H., Kamimura, T., and Yasuoka, S., *Human airway trypsin-like protease increases mucin gene expression in airway epithelial cells*. American Journal Respiratory Cellular Molecular Biology, 2004. 30(4): p. 470-8.
109. Michishige, F., Kanno, K., Yoshinaga, S., Hinode, D., Takehisa, Y., and Yasuoka, S., *Effect of saliva collection method on the concentration of protein components in saliva*. Journal Medical Investigation, 2006. 53(1-2): p. 140-6.
110. Puente, X.S. and Lopez-Otin, C., *A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors*. Genome Research, 2004. 14(4): p. 609-622.
111. Petersen, L.C., Birktoft, J.J., and Flodgaard, H., *Binding of bovine pancreatic trypsin inhibitor to heparin binding protein/CAP37/azurocidin*. European Journal of Biochemistry, 1993. 214(1): p. 271-279.
112. Zollner, H., *Frontmatter*, in *Handbook of Enzyme Inhibitors* 2008, Wiley-VCH Verlag GmbH. p. i-xi.
113. Aulak, K.S., Davis, A.E., 3rd, Donaldson, V.H., and Harrison, R.A., *Chymotrypsin inhibitory activity of normal C1-inhibitor and a P1 Arg to His mutant: evidence for the presence of overlapping reactive centers*. Protein Science, 1993. 2(5): p. 727-32.
114. Darling, M.R., Jackson-Boeters, L., Daley, T.D., and Diamandis, E.P., *Human kallikrein 13 expression in salivary gland tumors*. International Journal Biological Markers, 2006. 21(2): p. 106-10.
115. Darling, M.R., Jackson-Boeters, L., Daley, T.D., and Diamandis, E.P., *Human kallikrein 6 expression in salivary gland tumors*. Journal Histochemistry Cytochemistry, 2006. 54(3): p. 337-42.
116. Hatzizisis, D., Gaitanaki, C., and Beis, I., *Degradation of myofibrillar proteins by a calpain-like proteinase in the arm muscle of Octopus vulgaris*. J Comp Physiol B, 2000. 170(5-6): p. 447-56.
117. Fang, X., Yang, L., Wang, W., Song, T., Lee, C.S., Devoe, D.L., and Balgley, B.M., *Comparison of electrokinetics-based multidimensional separations coupled with electrospray ionization-tandem mass spectrometry for characterization of human salivary proteins*. Analytical Chemistry, 2007. 79(15): p. 5785-5792.
118. *Surface modification and characterization of magnetic polymer nanospheres prepared by miniemulsion polymerization*. Langmuir, 2004. 20(23): p. 10278.
119. Grigorescu, G., Petrescu, L., Gafar, M., Dumitrescu, M., Popescu, M., and Tanase-Mogos, I., *[Lysozyme and carboxypeptidase in the saliva of patients with periodontopathies]*. Revista Chirurgie Oncologie Radiologie O R L Oftalmologie Stomatologie Seria: Stomatologie, 1986. 33(2): p. 99-107.
120. Wu, M., Kodani, I., Dickinson, D., Huff, F., Ogbureke, K.U., Qin, H., Arun, S., Dulebohn, R., Al-Shabrawey, M., Tawfik, A., Prater, S., Lewis, J., Wataha, J., Messer, R., and Hsu, S., *Exogenous expression of caspase-14 induces tumor suppression in human salivary cancer cells by inhibiting tumor vascularization*. Anticancer Research, 2009. 29(10): p. 3811-8.

121. Hu, S.M., Snipas, S.J., Vincenz, C., Salvesen, G., and Dixit, V.M., *Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease*. Journal of Biological Chemistry, 1998. 273(45): p. 29648-29653.
122. Ando, K., [Collagenase, dipeptidylpeptidase IV, and cathepsin D activities in gingival fluid and whole saliva from patients with periodontal disease (author's transl)]. Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi, 1980. 22(3): p. 387-402.
123. Konttinen, Y.T., Kaapa, E., Hukkanen, M., Gu, X.H., Takagi, M., Santavirta, S., Alaranta, H., Li, T.F., and Suda, A., *Cathepsin G in degenerating and healthy discal tissue*. Clinical Experimental Rheumatology, 1999. 17(2): p. 197-204.
124. Jayakumar, A., Kang, Y., Frederick, M.J., Pak, S.C., Henderson, Y., Holton, P.R., Mitsudo, K., Silverman, G.A., AK, E.L.-N., Bromme, D., and Clayman, G.L., *Inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K and L by the serpin headpin (SERPINB13): a kinetic analysis*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2003. 409(2): p. 367-74.
125. Leissring, M.A., Malito, E., Hedouin, S., Reinstatler, L., Sahara, T., Abdul-Hay, S.O., Choudhry, S., Maharvi, G.M., Fauq, A.H., Huzarska, M., May, P.S., Choi, S., Logan, T.P., Turk, B.E., Cantley, L.C., Manolopoulou, M., Tang, W.-J., Stein, R.L., Cuny, G.D., and Selkoe, D.J., *Designed Inhibitors of Insulin-Degrading Enzyme Regulate the Catabolism and Activity of Insulin*. PLoS One, 2010. 5(5): p. e10504.
126. Halinen, S., Sorsa, T., Ding, Y., Ingman, T., Salo, T., Konttinen, Y.T., and Saari, H., *Characterization of matrix metalloproteinase (MMP-8 and -9) activities in the saliva and in gingival crevicular fluid of children with Down's syndrome*. Journal Periodontology, 1996. 67(8): p. 748-54.
127. Makela, M., Salo, T., Uitto, V.-J., and Larjava, H., *Matrix Metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the Oral Cavity: Cellular Origin and Relationship to Periodontal Status*. Journal Dental Research, 1994. 73(8): p. 1397-1406.
128. Westernoff, T.H., Jordan, R.C., Regezi, J.A., Ramos, D.M., and Schmidt, B.L., *Beta-6 Integrin, tenascin-C, and MMP-1 expression in salivary gland neoplasms*. Oral Oncology, 2005. 41(2): p. 170-4.
129. Capper, S.J., Verheijen, J., Smith, L., Sully, M., Visser, H., and Hanemaaijer, R., *Determination of gelatinase-A (MMP-2) activity using a novel immunocapture assay*. Inhibition of Matrix Metalloproteinases: Therapeutic Applications, 1999. 878: p. 487-490.
130. Smacchi, E., Gobbetti, M., Lanciotti, R., and Fox, P.F., *Purification and characterization of an extracellular proline iminopeptidase from Arthrobacter nicotianae 9458*. FEMS Microbiology Letters, 1999. 178(1): p. 191-7.
131. Medrano, F.J., Alonso, J., Garcia, J.L., Romero, A., Bode, W., and Gomis-Ruth, F.X., *Structure of proline iminopeptidase from Xanthomonas campestris pv. citri: a prototype for the prolyl oligopeptidase family*. EMBO Journal, 1998. 17(1): p. 1-9.
132. Iwashita, K., Kitamura, K., Narikiyo, T., Adachi, M., Shiraishi, N., Miyoshi, T., Nagano, J., Tuyen, D.G., Nonoguchi, H., and Tomita, K., *Inhibition of prostasin secretion by serine protease inhibitors in the kidney*. Journal of the American Society of Nephrology, 2003. 14(1): p. 11-16.
133. Kessler, E., Safrin, M., Abrams, W.R., Rosenbloom, J., and Ohman, D.E., *Inhibitors and specificity of Pseudomonas aeruginosa LasA*. Journal of Biological Chemistry, 1997. 272(15): p. 9884-9889.

134. Myung, J., Kim, K.B., and Crews, C.M., *The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors*. Medicinal Research Reviews, 2001. 21(4): p. 245-273.
135. Traut, R.R. and Monro, R.E., *The Puromycin Reaction and Its Relation to Protein Synthesis*. J Mol Biol, 1964. 10: p. 63-72.
136. Kohan, R., de Halac, I.N., Tapia Anzolini, V., Cismondi, A., Oller Ramirez, A.M., Paschini Capra, A., and de Kremer, R.D., *Palmitoyl Protein Thioesterase1 (PPT1) and Tripeptidyl Peptidase-I (TPP-I) are expressed in the human saliva. A reliable and non-invasive source for the diagnosis of infantile (CLN1) and late infantile (CLN2) neuronal ceroid lipofuscinoses*. Clinical Biochemistry, 2005. 38(5): p. 492-4.
137. Brix, K., Tepel, C., Broemme, D., and Herzog, V., *Cathepsins B and K in thyroid epithelial cells: Implications for the limited extracellular proteolysis of thyroglobulin*. Molecular Biology of the Cell, 1997. 8: p. 2622-2622.
138. Everts, V., Delaisse, J.M., Saftig, P., Korper, W., and Beertsen, W., *Cathepsin K deficiency, collagen degradation, and coupling of bone resorption and formation*. Journal of Bone and Mineral Research, 1999. 14: p. S357-S357.
139. Conner, G.E., *The role of the cathepsin D propeptide in sorting to the lysosome*. Journal Biological Chemistry, 1992. 267(30): p. 21738-45.
140. Victor, B.C., Anbalagan, A., Mostafa Mohamed, M., Sloane, B.F., and Cavallo-Medved, D., *Inhibition of cathepsin B activity attenuates extracellular matrix degradation and inflammatory breast cancer invasion*. Breast Cancer Research, 2011. 13(6): p. R115.
141. Nishimura, Y. and Kato, K., *Identification of Latent Procathepsin-H in Microsomal Lumen - Characterization of Proteolytic Processing and Enzyme Activation*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1988. 260(2): p. 712-718.
142. Richo, G. and Conner, G.E., *Proteolytic Activation of Human Procathepsin-D*. Structure and Function of the Aspartic Proteinases, 1991. 306: p. 289-296.
143. Towatari, T. and Katunuma, N., *Selective Cleavage of Peptide-Bonds by Cathepsin-L and Cathepsin-B from Rat-Liver*. Journal of Biochemistry, 1983. 93(4): p. 1119-1128.
144. Lador, U.S., Snyder, S.W., Wang, G.T., Holzman, T.F., and Krafft, G.A., *Cleavage at the Amino and Carboxyl Termini of Alzheimers Amyloid-Beta by Cathepsin-D*. Journal of Biological Chemistry, 1994. 269(28): p. 18422-18428.
145. Mei, Y., Chen, Y., Li, J., Gao, P., Wang, C., Zhang, H., Ling, F., Li, Y., Xie, S., Li, S., and Zhang, G., *Sequence identification, tissue distribution and polymorphism of the porcine cathepsin D (CTSD) gene*. Animal Biotechnology, 2008. 19(3): p. 144-58.
146. Murphy, P.A., Straat, P.A., Huang, P.C., and James, S.P., *Purification and Properties of Cathepsin-D Type Proteinase from Beef and Rabbit Lung and Its Identification in Macrophages*. Infection and Immunity, 1973. 8(6): p. 1000-1008.
147. Ferencik, M. and Stefanov, J., *Mechanism and Regulation of Degradation of Protein Antigens by Cathepsin-D*. Folia Microbiologica, 1970. 15(3): p. 229-&.
148. Lazarus, G.S., *Role of Neutral Proteinase and Cathepsin-D in Turpentine-Induced Inflammation*. Journal of Investigative Dermatology, 1974. 62(4): p. 367-371.
149. Vanarman, C.G., *Role of Kallikrein-Kinin System in Inflammation*. Life Sciences, 1975. 16(5): p. 822-823.

150. Mills, I.H., *Kallikrein, Kininogen and Kinins in Control of Blood-Pressure*. Nephron, 1979. 23(2-3): p. 61-71.
151. Yousef, G.M., Borgono, C., Polymeris, M., Soosaipillai, A., Scorilas, A., Harbeck, N., Schmalfeldt, B., Dorn, J., Schmitt, M., Chan, P., and Diamandis, E.P., *Human kallikrein 5 (hK5): A novel serum biomarker for ovarian and breast cancer*. Clinical Chemistry, 2003. 49(6): p. A96-A97.
152. Seiz, L., Kotzsch, M., Sweep, F., Fuessel, S., Lossnitzer, A., Schmitt, M., and Magdolen, V., *Kallikrein-Related Peptidase 4 (Klk4)-a Potential Biomarker in Prostate Cancer*. Tumor Biology, 2010. 31: p. S62-S63.
153. Davies, G.E., Holman, G., and Lowe, J.S., *Role of Hageman Factor in Activation of Guinea-Pig Pre-Kallikrein*. British Journal of Pharmacology and Chemotherapy, 1967. 29(1): p. 55-&.
154. Lee, T.C., Kushiro, T., Gassia, J.P., Girolami, J.P., Lupu, A.N., and Maxwell, M.H., *The kallikrein-kinin system in blood pressure homeostasis*. Clinical Science (London), 1979. 57 Suppl 5: p. 255s-258s.
155. Twining, S.S., *Regulation of Proteolytic Activity in Tissues*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1994. 29(5): p. 315-383.
156. Roche, A.S., *The Complete Guide for Protease Inhibition*.
157. Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., and Reed, J.C., *The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases*. EMBO Journal, 1997. 16(23): p. 6914-25.
158. Yin, Z., Patel, S.J., Wang, W.-L., Wang, G., Chan, W.-L., Rao, K.R.R., Alam, J., Jeyaraj, D.A., Ngew, X., Patel, V., Beer, D., Lim, S.P., Vasudevan, S.G., and Keller, T.H., *Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 1: Warhead*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2006. 16(1): p. 36-39.
159. Matthews, D.A., Dragovich, P.S., Webber, S.E., Fuhrman, S.A., Patick, A.K., Zalman, L.S., Hendrickson, T.F., Love, R.A., Prins, T.J., Marakovits, J.T., Zhou, R., Tikhe, J., Ford, C.E., Meador, J.W., Ferre, R.A., Brown, E.L., Binford, S.L., Brothers, M.A., DeLisle, D.M., and Worland, S.T., *Structure-assisted design of mechanism-based irreversible inhibitors of human rhinovirus 3C protease with potent antiviral activity against multiple rhinovirus serotypes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. 96(20): p. 11000-11007.
160. Marangoni, A.G., *Enzyme kinetics: a modern approach*. 2003.
161. Focke, M., Feld, A., and Lichtenthaler, K., *Allicin, a naturally occurring antibiotic from garlic, specifically inhibits acetyl-CoA synthetase*. Febs Letters, 1990. 261(1): p. 106-8.
162. Cleland, W.W., *The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. II. Inhibition: nomenclature and theory*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1963. 67: p. 173-87.
163. Jongbloed, R.H., Clement, J.M.A.M., and Borstpauwels, G.W.F.H., *Kinetics of NH_4^+ and K^+ Uptake by Ectomycorrhizal Fungi - Effect of NH_4^+ on K^+ Uptake*. Physiologia Plantarum, 1991. 83(3): p. 427-432.
164. Bauer, C., Osman, A.M., Cercignani, G., Gialluca, N., and Paolini, M., *A unified theory of enzyme kinetics based upon the systematic analysis of the variations of k_{cat} , and K_M , and*

k(cat)/K-M and the relevant Delta G(0 not equal) values - possible implications in chemotherapy and biotechnology. Biochemical Pharmacology, 2001. 61(9): p. 1049-1055.

165. Back, D.J., Tjia, J.F., Karbwang, J., and Colbert, J., *In vitro inhibition studies of tolbutamide hydroxylase activity of human liver microsomes by azoles, sulphonamides and quinolines. British Journal Clinical Pharmacology, 1988. 26(1): p. 23-9.*
 166. Barrett, A.J. and Starkey, P.M., *The interaction of alpha 2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. Biochemical Journal, 1973. 133(4): p. 709-24.*
 167. Potetinova, J.V., Milgotina, E.I., Makarov, V.A., and Voyushina, T.L., *Synthesis of Modified Peptides with C-Terminal α -Amino Aldehydes. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2001. 27(3): p. 141-150.*
 168. Dufour, E., Storer, A.C., and Menard, R., *Peptide Aldehydes and Nitriles as Transition State Analog Inhibitors of Cysteine Proteases. Biochemistry, 1995. 34(28): p. 9136-9143.*
 169. Lee, D.H. and Goldberg, A.L., *Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in Saccharomyces cerevisiae. Journal of Biological Chemistry, 1996. 271(44): p. 27280-4.*
 170. Abrahamson, M., Barrett, A.J., Salvesen, G., and Grubb, A., *Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. Journal of Biological Chemistry, 1986. 261(24): p. 11282-9.*
 171. Auld, D., *Zinc catalysis in metalloproteases*
- Metal Sites in Proteins and Models, H. Hill, P. Sadler, and A. Thomson, Editors. 1997, Springer Berlin / Heidelberg. p. 29-50.*
172. Spinale, F.G., Coker, M.L., Krombach, S.R., Mukherjee, R., Hallak, H., Houck, W.V., Clair, M.J., Kribbs, S.B., Johnson, L.L., Peterson, J.T., and Zile, M.R., *Matrix Metalloproteinase Inhibition During the Development of Congestive Heart Failure : Effects on Left Ventricular Dimensions and Function. Circulation Research, 1999. 85(4): p. 364-376.*
 173. Travis, J. and Salvesen, G.S., *Human-Plasma Proteinase-Inhibitors. Annual Review of Biochemistry, 1983. 52: p. 655-709.*
 174. Bayer, *Bayer Temporarily Suspends Global Trasylol®. 2007.*
 175. Mannucci, P.M., *Hemostatic drugs. New England Journal of Medicine, 1998. 339(4): p. 245-253.*
 176. Mahdy, A.M. and Webster, N.R., *Perioperative systemic haemostatic agents. British Journal of Anaesthesia, 2004. 93(6): p. 842-858.*
 177. Richardson, J.S., *The anatomy and taxonomy of protein structure. Advances Protein Chemistry, 1981. 34: p. 167-339.*
 178. SigmaAldrich, *Aprotinin.*
 179. H. Zollner, E., *Handbook of Enzyme Inhibitors. 1993.*
 180. Stubbs, M.T., Laber, B., Bode, W., Huber, R., Jerala, R., Lenarcic, B., and Turk, V., *The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine*

- proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction*. EMBO Journal, 1990. 9(6): p. 1939-47.
181. Mock, W.L. and Cheng, H., *Principles of Hydroxamate Inhibition of Metalloproteases: Carboxypeptidase A†*. Biochemistry, 2000. 39(45): p. 13945-13952.
 182. Kates, A.S. and K., T., *ADMET for medicinal chemists: A pratical guide*. 2011.
 183. Mcadoo, M.H., Dannenbe.Am, Hayes, C.J., James, S.P., and Sanner, J.H., *Inhibition of Cathepsin D-Type Proteinase of Macrophages by Pepstatin, a Specific Pepsin Inhibitor, and Other Substances*. Infection and Immunity, 1973. 7(4): p. 655-665.
 184. Marciniszyn, J., Hartsuck, J.A., and Tang, J., *Mode of Inhibition of Acid Proteases by Pepstatin*. Journal of Biological Chemistry, 1976. 251(22): p. 7088-7094.
 185. Schmidt, P.G., Bernatowicz, M.S., and Rich, D.H., *Pepstatin binding to pepsin. Enzyme conformation changes monitored by nuclear magnetic resonance*. Biochemistry, 1982. 21(26): p. 6710-6716.
 186. McKown, M.M., Workman, R.J., and Gregerman, R.I., *Pepstatin inhibition of human renin. Kinetic studies and estimation of enzyme purity*. Journal of Biological Chemistry, 1974. 249(24): p. 7770-4.
 187. Moyle, G. and Gazzard, B., *Current knowledge and future prospects for the use of HIV protease inhibitors*. Drugs, 1996. 51(5): p. 701-12.
 188. Bumb, A., Brechbiel, M.W., Choyke, P.L., Fugger, L., Eggeman, A., Prabhakaran, D., Hutchinson, J., and Dobson, P.J., *Synthesis and characterization of ultra-small superparamagnetic iron oxide nanoparticles thinly coated with silica*. Nanotechnology, 2008. 19(33): p. 335601.
 189. Liu, J., Sun, Z., Deng, Y., Zou, Y., Li, C., Guo, X., Xiong, L., Gao, Y., Li, F., and Zhao, D., *Highly Water-Dispersible Biocompatible Magnetite Particles with Low Cytotoxicity Stabilized by Citrate Groups*. Angewandte Chemie International Edition, 2009. 48(32): p. 5875-5879.
 190. Wang, Q., Iancu, N., and Seo, D.-K., *Preparation of Large Transparent Silica Monoliths with Embedded Photoluminescent CdSe@ZnS Core/Shell Quantum Dots*. Chemistry of Materials, 2005. 17(19): p. 4762-4764.
 191. Kim, J., Lee, J.E., Lee, J., Yu, J.H., Kim, B.C., An, K., Hwang, Y., Shin, C.-H., Park, J.-G., Kim, J., and Hyeon, T., *Magnetic Fluorescent Delivery Vehicle Using Uniform Mesoporous Silica Spheres Embedded with Monodisperse Magnetic and Semiconductor Nanocrystals*. Journal of the American Chemical Society, 2005. 128(3): p. 688-689.
 192. Lin, P.-C., Chou, P.-H., Chen, S.-H., Liao, H.-K., Wang, K.-Y., Chen, Y.-J., and Lin, C.-C., *Ethylene Glycol-Protected Magnetic Nanoparticles for a Multiplexed Immunoassay in Human Plasma*. Small, 2006. 2(4): p. 485-489.
 193. Lin Pc Fau - Tseng, M.-C., Tseng Mc Fau - Su, A.-K., Su Ak Fau - Chen, Y.-J., Chen Yj Fau - Lin, C.-C., and Lin, C.C., *Functionalized magnetic nanoparticles for small-molecule isolation, identification, and quantification*. (0003-2700 (Print)).
 194. Lopez-Cruz, A., Barrera, C., Calero-DdelC, V.L., and Rinaldi, C., *Water dispersible iron oxide nanoparticles coated with covalently linked chitosan*. Journal of Materials Chemistry, 2009. 19(37): p. 6870-6876.

195. Ding Z. and Grimmond B.J., *Chelator-Functionalized Nanoparticles*. Patent Application Publication, 2009. US 2009/0087381 A1.
196. Vitorino R Fau - Guedes, S., Guedes S Fau - Manadas, B., Manadas B Fau - Ferreira, R., Ferreira R Fau - Amado, F., and Amado, F., *Toward a standardized saliva proteome analysis methodology*. (1876-7737 (Electronic)).
197. Vitorino, R., Barros, A., Caseiro, A., Domingues, P., Duarte, J., and Amado, F., *Towards defining the whole salivary peptidome*. *PROTEOMICS – Clinical Applications*, 2009. 3(5): p. 528-540.
198. Ming, Z., Brian, L.C., and Charles, J.O.C., *Synthesis and characterization of monodisperse ultra-thin silica-coated magnetic nanoparticles*. *Nanotechnology*, 2008. 19(8): p. 085601.
199. Čampelj, S., Makovec, D., and Drofenik, M., *Functionalization of magnetic nanoparticles with 3-aminopropyl silane*. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2009. 321(10): p. 1346-1350.
200. Pietro Russo, D.A., Mariano Palomba, *et al.*, *UltrafineMagnetite Nanopowder: Synthesis, Characterization, and Preliminary Use as Filler of Polymethylmethacrylate Nanocomposites*. *Journal of Nanotechnology*, 2012.
201. Mahadevan, S., Gnanaprakash, G., Philip, J., Rao, B.P.C., and Jayakumar, T., *X-ray diffraction-based characterization of magnetite nanoparticles in presence of goethite and correlation with magnetic properties*. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 2007. 39(1): p. 20-25.
202. Panagiotis, D., Vasilios, G., Dimitrios, N., Philomela, K., Thomas, K., and Dimitrios, P., *Synthesis, characterization and thermal properties of polymer/magnetite nanocomposites*. *Nanotechnology*, 2006. 17(8): p. 2046.
203. *Powder Diffraction File, Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS). File No.19-629.*
204. Dorset, D.L., *X-ray Diffraction: A Practical Approach*. (1431-9276 (Print)).
205. Hou, Y., Yu, J., and Gao, S., *Solvothermal reduction synthesis and characterization of superparamagnetic magnetite nanoparticles*. *Journal of Materials Chemistry*, 2003. 13(8): p. 1983-1987.
206. Yu, S. and Chow, G.M., *Carboxyl group (-CO₂H) functionalized ferrimagnetic iron oxide nanoparticles for potential bio-applications*. *Journal of Materials Chemistry*, 2004. 14(18): p. 2781-2786.
207. Namduri, H. and Nasrazadani, S., *Quantitative analysis of iron oxides using Fourier transform infrared spectrophotometry*. *Corrosion Science*, 2008. 50(9): p. 2493-2497.
208. Liu J Fau - Sun, Z., Sun Z Fau - Deng, Y., Deng Y Fau - Zou, Y., Zou Y Fau - Li, C., Li C Fau - Guo, X., Guo X Fau - Xiong, L., Xiong L Fau - Gao, Y., Gao Y Fau - Li, F., Li F Fau - Zhao, D., and Zhao, D., *Highly water-dispersible biocompatible magnetite particles with low cytotoxicity stabilized by citrate groups*. (1521-3773 (Electronic)).
209. Hu, M., Yu, H., Wei, F., Xu, G., Yang, J., Cai, Z., and Hu, Q., *Citrate-capped Mn-modified CdSe/CdS quantum dots as luminescent probes for levodopa detection in aqueous solution*.

- Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2012. 91(0): p. 130-135.
210. Larkin, P., *Infrared and Raman Spectroscopy; Principles and Spectral Interpretation* 2011: Elsevier Science.
 211. Brownson, J.R.S., Tejedor-Tejedor, M.I., and Anderson, M.A., *FTIR Spectroscopy of Alcohol and Formate Interactions with Mesoporous TiO₂ Surfaces*. The Journal of Physical Chemistry B, 2006. 110(25): p. 12494-12499.
 212. Peng, H., Alemany, L.B., Margrave, J.L., and Khabashesku, V.N., *Sidewall Carboxylic Acid Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes*. Journal of the American Chemical Society, 2003. 125(49): p. 15174-15182.
 213. Stuart, B.H., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications* 2004: John Wiley & Sons.
 214. Nyquist, R.A., *Interpreting Infrared, Raman, and Nuclear Magnetic Resonance Spectra: Variables in data interpretation of infrared and Raman spectra* 2001: Academic Press.
 215. Smith, B.C., *Infrared Spectral Interpretation: A Systematic Approach* 1998: Taylor & Francis.
 216. Mahmoudi, M., Simchi, A., Imani, M., and Häfeli, U.O., *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Rigid Cross-linked Polyethylene Glycol Fumarate Coating for Application in Imaging and Drug Delivery*. The Journal of Physical Chemistry C, 2009. 113(19): p. 8124-8131.
 217. Daniel-da-Silva, A.L., Pinto, F., Lopes-da-Silva, J.A., Trindade, T., Goodfellow, B.J., and Gil, A.M., *Rheological behavior of thermoreversible κ -carrageenan/nanosilica gels*. Journal of Colloid and Interface Science, 2008. 320(2): p. 575-581.
 218. Reichenbacher, M. and Popp, J., *Challenges in Molecular Structure Determination* 2012: Springer.
 219. Kralj, S., Drogenik, M., and Makovec, D., *Controlled surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles with terminal amino and carboxyl groups*. Journal of Nanoparticle Research, 2011. 13(7): p. 2829-2841.
 220. Instruments, M., *Zeta Potential An Introduction in 30 Minutes*. Malvern Website.
 221. Li, D., Teoh, W.Y., Gooding, J.J., Selomulya, C., and Amal, R., *Functionalization Strategies for Protease Immobilization on Magnetic Nanoparticles*. Advanced Functional Materials, 2010. 20(11): p. 1767-1777.
 222. S. Yean, L.C., C.T. Yavuz, J.T. Mayo, W.W. Yu, A.T. Kan, V.L. Colvin and M.B. Tomson (2005). Effect of magnetite particle size on adsorption and desorption of arsenite and arsenate. Journal of Materials Research, 20, pp 3255-3264
 223. HANEDA, K. and MORRISH, A., H., *MAGNETITE TO MAGHEMITE TRANSFORMATION IN ULTRAFINE PARTICLES*. Journal Physical Colloques, 1977. 38(C1): p. C1-321-C1-323.
 224. Ma, H.-l., Qi, X.-r., Maitani, Y., and Nagai, T., *Preparation and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. 333(1-2): p. 177-186.
 225. Ma, M., Zhang, Y., Yu, W., Shen, H.Y., Zhang, H.Q., and Gu, N., *Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2003. 212(2-3): p. 219-226.

226. Feng, B., Hong, R.Y., Wang, L.S., Guo, L., Li, H.Z., Ding, J., Zheng, Y., and Wei, D.G., *Synthesis of Fe₃O₄/APTES/PEG diacid functionalized magnetic nanoparticles for MR imaging*. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2008. 328(1-3): p. 52-59.
227. Pretsch, E., Bühlmann, P., and Badertscher, M., *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data* 2009: Springer London, Limited.
228. Stuart, B., *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*, ACOL Series, Wiley, Chichester, UK, 1997.
229. Stuart, B.H. and Ando, D.J., *Biological Applications of Infrared Spectroscopy* 1997: John Wiley & Sons.
230. Taira, S., Kaneko, D., Onuma, K., Miyazato, A., Hiroki, T., Kawamura-Konishi, Y., and Ichiyanagi, Y., *Synthesis and Characterization of Functionalized Magnetic Nanoparticles for the Detection of Pesticide*. International Journal of Inorganic Chemistry, 2012. 2012: p. 7.
231. Lattuada, M. and Hatton, T.A., *Functionalization of Monodisperse Magnetic Nanoparticles*. Langmuir, 2006. 23(4): p. 2158-2168.
232. Pryce, R.S. and Hench, L.L., *Tailoring of bioactive glasses for the release of nitric oxide as an osteogenic stimulus*. Journal of Materials Chemistry, 2004. 14(14): p. 2303-2310.
233. Valeur, E. and Bradley, M., *Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents*. Chemical Society Reviews, 2009. 38(2): p. 606-631.
234. Lu, A.H., Salabas, E.L., and Schuth, F., *Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application*. Angewandte Chemie-International Edition, 2007. 46(8): p. 1222-1244.
235. Mazzoni A Fau - Mannello, F., Mannello F Fau - Tay, F.R., Tay Fr Fau - Tonti, G.A.M., Tonti Ga Fau - Papa, S., Papa S Fau - Mazzotti, G., Mazzotti G Fau - Di Lenarda, R., Di Lenarda R Fau - Pashley, D.H., Pashley Dh Fau - Breschi, L., and Breschi, L., *Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin*. (0022-0345 (Print)).
236. Okada Y Fau - Morodomi, T., Morodomi T Fau - Enghild, J.J., Enghild Jj Fau - Suzuki, K., Suzuki K Fau - Yasui, A., Yasui A Fau - Nakanishi, I., Nakanishi I Fau - Salvesen, G., Salvesen G Fau - Nagase, H., and Nagase, H., *Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties*. (0014-2956 (Print)).
237. Dragutinovic Vv Fau - Radovanovic, N.S., Radovanovic Ns Fau - Izrael-Zivkovic, L.T., Izrael-Zivkovic Lt Fau - Vrvic, M.M., and Vrvic, M.M., *Detection of gelatinase B activity in serum of gastric cancer patients*. (1007-9327 (Print)).
238. Consortium, T.U. *Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt)*. 2011 22 November 2012]; Available from: <http://www.uniprot.org/>.
239. *Myoglobin*. 2012 21 february 2012]; Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P02144>.
240. Skoog, D.A., West, D.M., and Holler, F.J., *Fundamentals of analytical chemistry* 1988: Saunders College Pub.
241. Scheer M., G.A., Chang A., Schomburg I., Munaretto C., Rother M., Söhngen C., Stelzer M., Thiele J. & Schomburg D. . *BRENDA, the enzyme information system*. 2011 15-11-2012]; Available from: <http://www.brenda-enzymes.info/>.

242. Al-Tarawneh, S.K., Border, M.B., Dibble, C.F., and Bencharit, S., *Defining Salivary Biomarkers Using Mass Spectrometry-Based Proteomics: A Systematic Review*. *Omics-a Journal of Integrative Biology*, 2011. 15(6): p. 353-361.
243. Hu, S., Xie, Y.M., Ramachandran, P., Loo, R.R.O., Li, Y., Loo, J.A., and Wong, D.T., *Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry*. *Proteomics*, 2005. 5(6): p. 1714-1728.

6. Anexos

Tabela de dados de difratograma de raios-X da magnetite

Pos. [°2Th.]	Height [cts]	d-spacing [Å]	Rel. Int. [%]	Area [cps*°2Th.]	Area [cts*°2Th.]	Area calc.	FWHM Asymmetry Ratio	Obs. B [°2Th.]	Instr. B [°2Th.]	Shape Asymmetry Ratio	Matched by
18.3505	1134.57	4.83082	100.00	2.28	136.15	0.00		0.12000	0.11951		04-008-8145
30.2649	674.95	2.95076	59.49	1.36	80.99	0.00		0.12000	0.11759		04-008-8145
35.5721	853.56	2.52174	75.23	1.72	102.43	0.00		0.12000	0.11724		04-008-8145
36.7636	571.93	2.44270	50.41	1.15	68.63	0.00		0.12000	0.11721		
43.3706	617.41	2.08466	54.42	1.24	74.09	0.00		0.12000	0.11737		
53.4436	313.76	1.71307	27.65	0.63	37.65	0.00		0.12000	0.11886		
57.2345	443.04	1.60829	39.05	0.89	53.17	0.00		0.12000	0.11986		04-008-8145
62.7584	647.78	1.47935	57.09	1.30	77.73	0.00		0.12000	0.12183		04-008-8145
								0	3		

Ref. Code	Score	Compound Name	Displacement [°2Th.]	Scale Factor	Chemical Formula	ICSD Name	Mineral Name	Quality	RIR	SemiQuant [%]	Space Group	Crystal System
04-008-8145	54	Iron Oxide	0.083	0.949	Fe ₃ O ₄		magnetite, syn	S;NAP; ALT	5.050	100	Fd-3m	Cubic

Fig. 1 - Tabela de resultados de difratograma de raios-X da magnetite

Difratograma de raios-X das NPs após funcionalização com EDTA-TMS

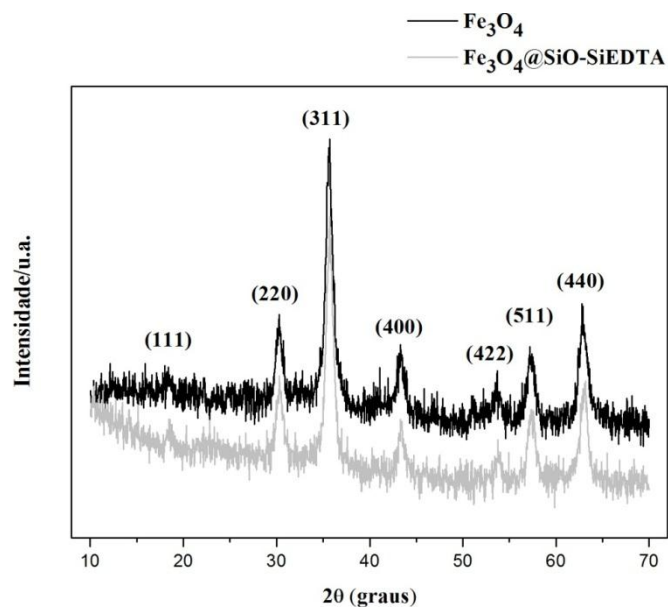


Fig. 2 - Difratogramas de raios-X da magnetite e magnetite após funcionalização com EDTA-TMS

Libertação de íons metálicos para a solução e Alteração da cor das NPs após funcionalização



Figura 24 - (Esquerda) – Nanopartículas e solução após funcionalização com EDTA-TMS; (Direita) – Nanopartículas e solução antes de funcionalização com EDTA-TMS;

Espetro Infravermelho NPs acopladas com Aprotinina

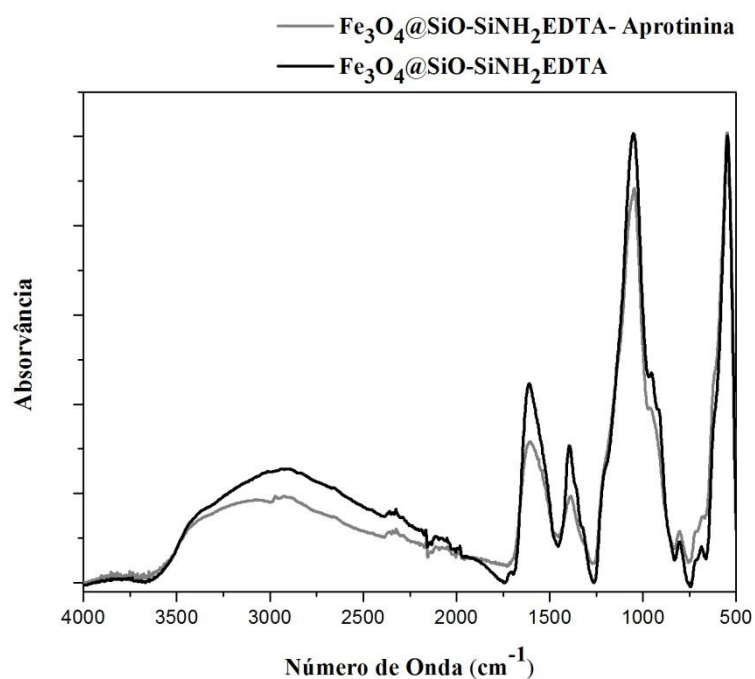


Figura 25 - Espetro de infravermelho NPs acopladas com aprotinina e NPs funcionalizadas com EDTA-TMS